

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II**



**Diseño de herramientas bioquímicas para la ingeniería  
molecular de derivados inmovilizados de Renina y Beta-  
Galactosidasa**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Guadalupe Penzol Alonso**

**Director**

**José Manuel Guisán Seijas**

**Madrid 2005**

**ISBN: 978-84-8466-906-7**

**© Guadalupe Penzol Alonso, 1996**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

**DISEÑO DE HERRAMIENTAS BIOQUIMICAS  
PARA LA INGENIERIA MOLECULAR DE DERIVADOS  
INMOVILIZADOS DE RENINA Y  $\beta$ -GALACTOSIDASA**

GUADALUPE PENZOL ALONSO

1996

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

**DISEÑO DE HERRAMIENTAS BIOQUIMICAS**  
**PARA LA INGENIERIA MOLECULAR DE DERIVADOS**  
**INMOVILIZADOS DE RENINA Y  $\beta$ -GALACTOSIDASA**

**MEMORIA que para optar**  
**al grado de Doctor en Farmacia presenta**  
**GUADALUPE PENZOL ALONSO**

**Director:**  
**Dr. José Manuel Guisán Seijas**  
**Departamento de Biocatálisis**  
**I.C.P. - C.S.I.C.**

**Tutor:**  
**Dr. Angel Jiménez Solves**  
**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Farmacia- U.C.M**

**INSTITUTO DE CATALISIS Y PETROLEOQUIMICA**  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS**

**MADRID-1996**

# INDICE

## ABREVIATURAS

## PRODUCTOS COMERCIALES

INTRODUCCION GENERA	1
1. INTERES INDUSTRIAL POR LA UTILIZACION DE ENZIMAS	2
1.1. INMOVILIZACION DE ENZIMAS	2
1.1.1. INMOVILIZACION DE ENZIMAS POR UNION COVALENTE ASOPORTES SOLIDOS PREEXISTENTES	6
▶ Inmovilización covalente de enzimas sobre soporte glioxil-agarosa	6
1.2. UTILIZACION DE ENZIMAS EN INDUSTRIA LACTEA	8
OETIVOS GENERALES	12

\* \* \*

## CAPITULO I:

*Inmovilización de enzimas que actúan sobre sustratos macromoleculares:*

*Inmovilización de renina de Mucor miehei para la hidrólisis de caseína* 15

INTRODUCCION	16
1. INMOVILIZACION DE PROTEINAS/ENZIMAS QUE ACTUAN SOBRE LIGANDOS/SUBSTRATOS MACROMOLECULARES	16
2. RENINA, ENZIMA-MODELO PARA EL DESARROLLO DE TECNICAS DE INMOVILIZACION DE ENZIMAS QUE ACTUAN SOBRE SUBSTRATOS MACROMOLECULARES	24
2.1. COAGULACION DE LA LECHE: ESTABILIDAD MICELAR, MECANISMOS DE LA COAGULACION Y ENZIMAS COAGULANTES	24
2.2. UTILIZACION DE DERIVADOS INMOVILIZADOS DE RENINA	27
2.3. RENINA DE <i>Mucor miehei</i>	29



METODOS	30
1. ACTIVACION DE LOS SOPORTES	30
1.1. DISTINTAS ACTIVACIONES DEL SOPORTE DE AGAROSA	30
1.1.1. PREPARACION DEL SOPORTE GLIOXIL-AGAROSA	30
1.1.2. PREPARACION DEL SOPORTE MANA-AGAROSA	30
1.1.3. PREPARACION DEL SOPORTE GLUTARALDEHIDO-AGAROSA	31
1.1.4. PREPARACION DE SOPORTES BDE-AGAROSA	31
1.1.5. PREPARACION DE SOPORTES DEXTRANO-AGAROSA	32
▶ Preparación del soporte dextrano-agarosa-I	32
▶ Preparación del soporte dextrano-agarosa-II	33
1.2. ACTIVACION DE SOPORTES TIPO RESINA	34
1.2.1. ACTIVACION DEL SOPORTE RESINA <i>TOYOPEARL</i> . PREPARACION DE SOPORTE GLIOXIL- <i>TOYOPEARL</i>	34
1.2.2. ACTIVACION DE LOS SOPORTES RESINA <i>EUPERGIT</i> Y RESINA <i>BIOSYNTH</i>	34
▶ Preparación de glioxil-resinas	34
▶ Preparación de MANA-resinas	35
2. ENSAYOS PARA LA DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS	35
2.1 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA RENINA	35
2.1.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD HIDROLITICA	35
2.1.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD COAGULANTE	36
2.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE TRIPSINA	36
3. SEMIPURIFICACION DE LA SOLUCION DE RENINA DE <i>Mucor miehei</i> COMERICAL	37
4. OXIDACION DE LAS CADENAS GLICOSIDICAS DE RENINA DE <i>Mucor miehei</i>	37
6. PREPARACION DE DERIVADOS ENZIMATICOS POR INMOVILIZACION	38
6.1. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA DE <i>Mucor miehei</i>	38
6.1.1. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA SOBRE GLIOXIL-SOPORTES (AGAROSA, <i>TOYOPEARL</i> Y <i>BIOSYNTH</i> )	38
6.1.2. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA SOBRE MANA-SOPORTES	39
▶ Inmovilización de renina a través de su fracción proteica a gel MANA-soportes	39
▶ Inmovilización de renina a través de su fracción glicosídica a MANA-soportes	40
6.1.3. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA SOBRE GEL GLUTARALDEHIDO-AGAROSA	40

6.1.4. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA SOBRE SOPORTES BDE-AGAROSA	41
6.1.5. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA SOBRE GELES DEXTRANO-AGAROSA	41
6.2. PREPARACION DE DERIVADOS DE TRIPSINA SOBRE GLIOXIL-SOPORTES (AGAROSA, <i>TOYOPEARL</i> , <i>EUPERGIT</i> Y <i>BIOSYNTH</i> )	41
RESULTADOS Y DISCUSION	43
1. ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA RENINA	43
2. CARACTERIZACION DEL EXTRACTO COMERCIAL DE <i>Mucor miehei</i>	46
3. ESTRATEGIAS PARA LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS QUE ACTUAN FRENTE A SUBSTRATOS MACROMOLECULARES	48
3.1. <u>Primera estrategia</u> : MODULACION DE LA ORIENTACION RELATIVA DE LA ENZIMA SOBRE EL SOPORTE	48
3.1.1. INMOVILIZACION A TRAVES DE LAS GRUPOS $\epsilon$ -AMINO SUPERFICIALES (Lys) DE LA ENZIMA SOBRE SOPORTES GLIOXIL-AGAROSA	48
3.1.2. INMOVILIZACION A TRAVES DE LOS GRUPOS CARBOXILO SUPERFICIALES (Asp y/o Glu) DE LA ENZIMA SOBRE SOPORTE MANA-AGAROSA	51
▶ Efecto de la modificación química con carbodiimida (CDI) sobre la actividad y estabilidad de la enzima en solución	51
▶ Efecto de la fuerza iónica del medio sobre la actividad de la enzima en solución	53
3.1.3. INMOVILIZACION A TRAVES DE LOS GRUPOS AMINO DE BAJO pK DE LA ENZIMA SOBRE SOPORTE GLUTARALDEHIDO-AGAROSA	57
3.1.4. INMOVILIZACION A TRAVES DE LAS CADENAS GLICOSIDICAS DE LA GLICOENZIMA SOBRE SOPORTE MANA-AGAROSA	59
▶ Efecto de la semipurificación y posterior oxidación con NaIO <sub>4</sub> sobre la actividad y estabilidad de la enzima en solución	59
3.2. <u>Segunda estrategia</u> : UTILIZACION DE SOPORTES CON DIFERENTE MORFOLOGIA INTERNA ( <i>Toyopearl</i> , <i>Eupergit</i> y <i>Biosynth</i> )	64
3.2.1. DETERMINACION DEL GRADO DE CONGRUENCIA GEOMETRICA DE SOPORTES CON DIFERENTE MORFOLOGIA INTERNA	65
▶ Estudio de las posibilidades de multiinteracción de cada soporte	67
3.2.2. CONTROL Y OPTIMIZACION DE LA INMOVILIZACION DE RENINA SOBRE SOPORTES DE MENOR CONGRUENCIA GEOMETRICA	70
▶ Inmovilización de renina de <i>Mucor miehei</i> a través de sus grupos amino superficiales (Lys) sobre soportes activados con grupos glioxilo	70

► Inmovilización de renina de <i>Mucor miehei</i> a través de sus cadenas glicosídicas sobre MANA-soportes	71
3.3. <u>Tercera estrategia:</u> UTILIZACION DE SOPORTES CON GRUPOS REACTIVOS CONVENIENTEMENTE DISTANCIADOS DE SU SUPERFICIE	72
3.3.1. UTILIZACION DE 1,4-butanodiol-diglicidoxi-éter (BDE) COMO AGENTE ESPACIADOR	73
► Preparación y optimización de soportes BDE-agarosa	73
► Estudio y control de la inmovilización	74
3.3.2. UTILIZACION DE DEXTRANO COMO AGENTE ESPACIADOR	75
► Preparación y optimización de soportes dextrano-agarosa	75
► Estudio y control de la inmovilización de renina de <i>Mucor miehei</i> sobre soportes dextrano-agarosa	79
5. COMPARACION DE LAS TRES ESTRATEGIAS. DISCUSION GENERAL	81

\* \* \*

## CAPITULO II:

*Inmovilización-estabilización de glicoenzimas: Inmovilización-estabilización de la  $\beta$ -galactosidasa de Aspergillus oryzae para la hidrólisis de lactosa* 88

INTRODUCCION	89
1. ESTABILIZACION DE ENZIMAS	89
2. INMOVILIZACION-ESTABILIZACION DE GLICOPROTEINAS	92
2.1. PROPUESTA DE ESTABILIZACION DE ENZIMAS GLICOSILADAS	93
3. $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>Aspergillus oryzae</i>	95
OBJETIVOS	97
METODOS	99
1. ACTIVACION DEL SOPORTE DE AGAROSA	99
2. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>Aspergillus oryzae</i>	99
3. SEMIPURIFICACION DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>Aspergillus oryzae</i>	99
4. MODIFICACION QUIMICA DE LA ENZIMA NATIVA CON ETILENDIAMINA (1,2-diaminoetano)	100
5. PREPARACION DE DERIVADOS DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>Aspergillus oryzae</i>	101

6. MODIFICACION QUIMICA CON $\text{NaIO}_4$ DE LOS DERIVADOS ENZIMATICOS	101
7. ENTRECRUZAMIENTO INTRAMOLECULAR	102
8. ENSAYOS DE ESTABILIDAD ENZIMATICA	103
RESULTADOS Y DISCUSION	104
1. SEMIPURIFICACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO COMERCIAL	104
2. INMOVILIZACION DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>A. oryzae</i> POR UNION COVALENTE SOBRE SOPORTE GLIOXIL-AGAROSA	105
3. ENRIQUECIMIENTO DE LA GLICOPROTEINA EN GRUPOS REACTIVOS SUPERFICIALES	108
3.1. MODIFICACION QUIMICA CON EDA DE LA ENZIMA EN SOLUCION	109
3.2. INMOVILIZACION COVALENTE SOBRE SOPORTE GLIOXIL-AGAROSA DE LA ENZIMA MODIFICADA CON EDA	111
► Estabilización térmica frente la correspondiente derivado <i>unipuntual</i>	116
3.3. EFECTO GLOBAL: MODIFICACION QUIMICA CON EDA + INMOVILIZACION COVALENTE MULTIPUNTUAL	118
4. ENTRECRUZAMIENTOS INTRAMOLECULARES	120
4.1. ACTIVACION DE LAS CADENAS GLICOSIDICAS DE LA ENZIMA POR MODIFICACION QUIMICA CON $\text{NaIO}_4$	121
4.2. ENTRECRUZAMIENTO INTRAMOLECULAR ENTRE LAS CADENAS GLICOSIDICAS OXIDADAS Y LOS RADICALES AMINO DE LA FRACCION PROTEICA DE LA GLICOPROTEINA INMOVILIZADA	123
5. DISCUSION GLOBAL	126

\* \* \*

### CAPITULO III:

*Inmovilización-estabilización de enzimas oligoméricas: Inmovilización-estabilización de las  $\beta$ -galactosidasas de *Kluyveromyces lactis* y de *Escherichi coli.* para la hidrólisis de lactosa*

130

INTRODUCCION	131
1. PROPUESTAS PARA LA ESTABILIZACION DE ENZIMAS OLIGOMERICAS	134
2. ESTABILIZACION DE ENZIMAS OLIGOMERICAS DEPENDIENTES DE CATIONES DIVALENTES	138
3. DOS ENZIMAS OLIGOMERICAS DE INTERES INDUSTRIAL	139

3.1. $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>Kluyveromyces lactis</i>	140
3.2. $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>Escherichia coli</i>	141
OBJETIVOS	143
METODOS	144
1. ACTIVACION DEL SOPORTE AGAROSA	144
2. PREPARACION DE DERIVADOS ENZIMATICOS	144
2.1. PREPARACION DE DERIVADOS DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>Kluyveromyces lactis</i>	144
2.1.1. PREPARACION DEL DERIVADO GLUTARALDEHIDO-AGAROSA-3	144
2.1.2. PREPARACION DEL DERIVADO GLUTARALDEHIDO-AGAROSA-75	145
2.1.3. PREPARACION DEL DERIVADO GLIOXIL-AGAROSA-75	145
2.2. PREPARACION DE DERIVADOS DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>Escherichia coli</i>	145
2.2.1. PREPARACION DEL DERIVADO GLIOXIL-AGAROSA	145
2.2.2. PREARACION DEL DERIVADO MANA-AGAROSA	146
2.2.3. PREPARACION DEL DERIVADO GLUTARALDEHIDO-AGAROSA-75	146
2.2.4. PREPARACION DEL DERIVADO GLUTARALDEHIDO-AGAROSA-3	146
3. PREPARACION DE AGENTES POLIFUNCIONALES	147
3.1. PREPARACION DE POLIMEROS POLIALDEHIDICOS	147
3.2. PREPARACION DE POLIMEROS POLIAMINICOS	147
4. ENTRECruzAMIENTO INTRAMOLECULAR CON AGENTES POLIFUNCIONALES DE LA ENZIMA INMOVILIZADA	148
4.1. ENTRECruzAMIENTO CON POLIMEROS POLIALDEHIDICOS	148
4.2. ENTRECruzAMIENTO CON POLIMEROS POLIAMINICOS	148
5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA	149
5.1. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASADE <i>K. lactis</i>	149
5.2. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>E. coli</i>	149
6. ENSAYOS DE ESTABILIDAD ENZIMATICA	149
6.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DILUCION SOBRE LA ESTABILIDAD ENZIMATICA	150
7. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE ACRILAMIDA CON SDS	150
RESULTADOS Y DISCUSION	152
1. $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>Kluyveromyces lactis</i>	152
1.1. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA ENZIMA SOLUBLE	152
1.2. DERIVADO PREPARADO SOBRE GEL GLUTARALDEHIDO-AGAROSA-3	154
1.3. DERIVADO PREPARADO SOBRE GEL GLUTARALDEHIDO-AGAROSA-75	158

1.4. DERIVADO PREPARADO SOBRE GEL GLIOXIL-AGAROSA-75	160
▶ Efecto de la dilución y de la presencia de cationes divalentes sobre la estabilidad del derivado glioxil-agarosa-75	162
1.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DERIVADOS ENZIMATICOS OBTENIDOS.	
DISCUSION	164
2. $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>Escherichia coli</i>	166
2.1. INMOVILIZACION MULTIPUNTUAL SOBRE DIFERENTES SOPORTES	167
▶ Inmovilización sobre soporte glioxil-agarosa-75	167
▶ Inmovilización sobre soporte MANA-agarosa-75	168
▶ Inmovilización sobre soporte glutaraldehído-agarosa-75	168
▶ Evaluación de las diferentes estrategias de inmovilización	168
2.2. ENTRECRUZAMIENTO CON AGENTES POLIFUNCIONALES DE ENZIMAS OLIGOMERICAS	171
2.2.1. ENTRECRUZAMIENTO SOBRE UN DERIVADO UNIPUNTUAL	171
▶ Inmovilización unipuntual sobre soporte glutaraldehído-agarosa	171
▶ Entrecruzamiento con polímeros polialdehídicos	172
▶ Entrecruzamiento con polímeros poliamínicos	173
2.2.2. ENTRECRUZAMIENTOS SOBRE UN DERIVADO MULTIPUNTUAL	174
▶ Entrecruzamiento con polímeros polialdehídicos	175
▶ Entrecruzamiento con polímeros poliamínicos	175
2.3. TERMOESTABILIDAD DE LOS DIFERENTES DERIVADOS INMOVILIZADOS	175
3. DISCUSION	179
* * *	
DISCUSION GLOBAL Y CONCLUSIONES	182
BIBLIOGRAFIA	188
* * *	

# **INTRODUCCION GENERAL**

## INTRODUCCION GENERAL

La tecnología enzimática entendida como la utilización por el hombre de la capacidad biocatalítica de las enzimas es tan antigua como el propio ser humano. La coagulación de la leche por su almacenamiento en recipientes fabricados con los estómagos de animales, el enterneamiento de la carne por tratamiento con hojas y frutos de determinadas plantas o la producción de bebidas alcohólicas son algunos de los procesos desarrollados antes de que se conociera tan siquiera la existencia de las enzimas o el proceso que catalizan. Fue en 1913 cuando L. Michaelis y M. L. Menten asentaron las bases de la enzimología con sus hipótesis sobre los mecanismos de las reacciones enzimáticas (1), dando el primer paso firme para la transformación de un "arte" transmitido de generación en generación en una tecnología con base científica.

### 1. INTERES INDUSTRIAL POR LA UTILIZACION DE ENZIMAS

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que actúan como catalizadores en procesos orgánicos intra o extracelulares. La complejidad de los medios biológicos en los que ejercen su función hace que sean moléculas muy *específicas* en relación al substrato con el que interaccionan, muy *selectivas* en cuanto a la reacción que sobre éste producen, y capaces de actuar, en general, en *medios acuosos*, a temperaturas moderadas, pHs cercanos a la neutralidad y presión atmosférica.

Estas características han planteado la posibilidad de la aplicación de las enzimas fuera de su medio natural en procesos químicos como alternativa a la utilización de los catalizadores químicos convencionales. Su **elevada actividad en condiciones suaves** de pH, temperatura y presión es importante para su empleo en procesos en los que intervienen substratos y/o productos lábiles; su **gran selectividad** evita la formación de productos secundarios, ofreciendo buenas expectativas de uso en reacciones de Química Fina; y su **alta especificidad** permite su actividad en mezclas complejas y así su aplicación en métodos analíticos, en el procesamiento de alimentos o en reacciones en las que intervienen compuestos quirales. Además su uso permite reducir ostensiblemente los



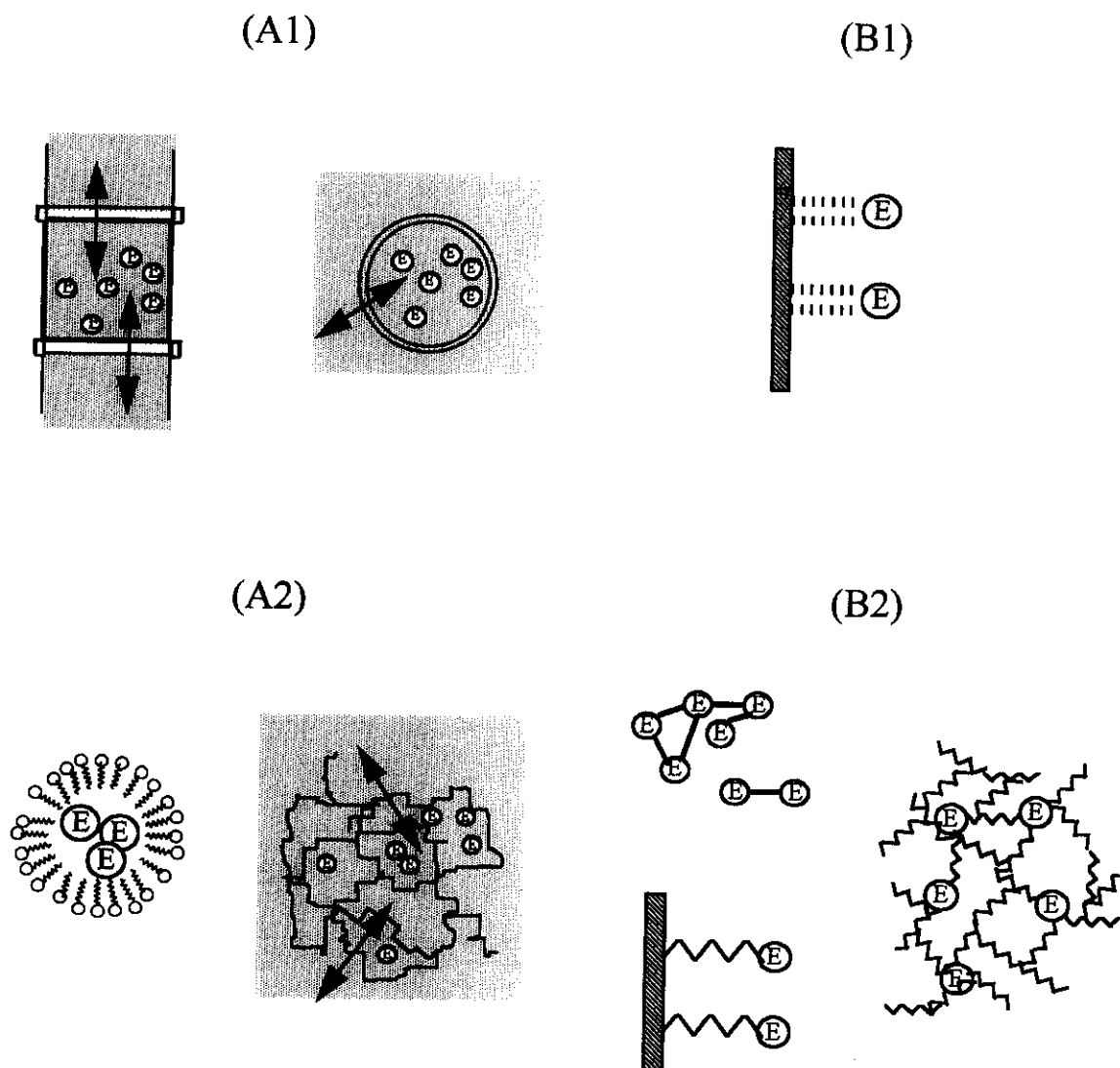
costes del proceso, tanto por el ahorro de energía como por eliminación de etapas posteriores de purificación.

Hasta ahora la implantación de las enzimas como catalizadores en procesos químicos a gran escala se ha visto condicionada por la dificultad de control de los procesos de catálisis homogénea, el alto coste del extracto enzimático, la pérdida de actividad enzimática durante las reacciones, la contaminación del producto final por la presencia del catalizador en solución, la dificultad de su eliminación de la mezcla de reacción y la imposibilidad de su reutilización. Todos estos inconvenientes derivan de trabajar con un catalizador homogéneo, que se solubiliza en la mezcla de reacción, y lábil en reacciones prolongadas. Por ello se han desarrollado multitud de estrategias para la inmovilización de las moléculas de catalizador activas en un sistema que permita la difusión de los sustratos hasta alcanzar la molécula de enzima, de forma que ésta pueda ejercer su actividad *sin salir de su recinto*.

## 1.1. INMOVILIZACION DE ENZIMAS

Bajo la denominación de *técnicas de inmovilización de proteínas* se recogen todos aquellos métodos que logran el *confinamiento o localización de las moléculas de enzima en cierto espacio definido y limitado de forma que retengan su actividad catalítica y que permitan su uso repetido*. Las estrategias desarrolladas con este fin se pueden organizar en dos grupos (Figura 0.1) según consistan en la retención física de la moléculas en un espacio limitado sin sufrir modificación alguna (A) o en la insolubilización por unión química de la moléculas entre sí o a una estructura sólida (B). Dentro del primer grupo de técnicas de inmovilización se agrupan aquellas que han desarrollado sistemas de confinamiento de la solución proteica dentro de un recinto semipermeable como los reactores de membrana, las fibras huecas o la microcápsulas (A1) y otros métodos en los que las moléculas se encuentran atrapadas en micelas reversas o en redes poliméricas (A2). El segundo gran grupo de estrategias para la inmovilización de proteínas a través de la insolubilización de la moléculas por interacción química se clasifican según la naturaleza de la citada interacción en: procesos no covalentes, o inmovilización por adsorción, en los cuales las uniones son mayoritariamente de tipo hidrofóbico o electrostático (B1), y en sistemas de insolubilización por formación de enlaces covalentes en los que participa la molécula de enzima (B2), que abarcan tanto procesos de

entrecruzamiento intermolecular con agentes bifuncionales de pequeño tamaño, como copolimerizaciones durante la formación de una matriz polimérica, o como la unión covalente a sólidos preexistentes.



**Figura 0.1.** Técnicas de inmovilización de enzimas (E): (A) Confinamiento; (B) Insolubilización.

La elección de una u otra estrategia de inmovilización para la obtención de derivados enzimáticos para ser utilizados como catalizadores en un determinado proceso químico dependerá de todos los factores que en él intervienen, es decir de las **propiedades y características intrínsecas de la enzima** (actividad, condiciones óptimas

de estabilidad, estructuras terciaria y cuaternaria), del tipo de reacción a catalizar (naturaleza, características y propiedades de sustratos y productos, condiciones óptimas de la reacción), de los condicionantes de tipo industrial dependientes del diseño del reactor enzimático (requerimientos operacionales, costes) y, en general, de las ventajas y propiedades adicionales que se deseen conseguir con dicho proceso de inmovilización.

Los métodos físicos y las uniones a soportes sólidos por adsorción favorecen una inmovilización suave y no distorsionante por la ausencia de interacciones químicas que afecten a la enzima, y permiten la inmovilización de varias enzimas e incluso de su correspondiente cofactor. El inconveniente de todas estas técnicas es la mínima o nula estabilización lograda por los derivados enzimáticos resultantes pues las moléculas se encuentran libres en el medio o unidas de forma reversible a la matriz, la única estabilización permitida se logra cuando se limitan las interacciones intermoleculares (agregación o proteólisis) o procesos de disociación de subunidades o pérdida del cofactor, por ello estrategias más agresivas en la que tiene lugar la participación de la enzima en uniones covalentes son la estrategias de elección cuando se pretende limitar las inactivaciones y/o la liberación de la enzima al medio de reacción.

La inmovilización de una enzima por formación de enlaces covalentes entre ella y el soporte o la matriz en la que se integra supone la *irreversibilidad de la unión* y, en consecuencia, grandes ventajas frente a otros sistemas de inmovilización de enzimas cuando se pretende conseguir no sólo un *catalizador heterogéneo* sino suficientemente estable. Si además el proceso permite la formación de numerosos enlaces en cada molécula de enzima, lo que se ha denominado *multiinteracción*, la fijación de la posición relativa de varios puntos de la molécula en el espacio, implica el aumento de la *rigidez de su estructura terciaria* y por lo tanto una importante limitación a posibles distorsiones de la conformación activa del biocatalizador provocadas por el medio, las condiciones o la duración de la reacción.

La idea de que la inmovilización a través de varios puntos a un determinado soporte debería ejercer un importante efecto estabilizador propuesta por Klivanov (2, 3), fue desarrollada con éxito por Mozhaev *et al.* (4, 5) y Martinek *et al.* (6) para enzimas copolimerizadas. Ante las limitaciones en cuanto a carga enzimática, propiedades mecánicas y problemas difusionales planteadas por la estructura porosa cerrada de los derivados preparados por copolimerización, así como la imposibilidad de control del grado de multiinteracción, se ha propuesto la unión covalente de enzimas sobre soportes

sólidos preexistentes como la más adecuada para la obtención de derivados enzimáticos inmovilizados y estabilizados.

### 1.1.1. INMOVILIZACION DE ENZIMAS POR UNION COVALENTE A SOPORTES SOLIDOS PREEXISTENTES

La unión covalente de enzimas a soportes sólidos preexistentes es la estrategia más utilizada debido principalmente a tres importantes propiedades conferidas a los derivados enzimáticos obtenidos por este sistema, además de las derivadas de la propia inmovilización. Estos atributos característicos son el **caracter covalente** y por lo tanto estable de la unión, la **estabilización** adicional que puede conferir la interacción cuando sea multipuntual y el **permitir manipulaciones posteriores** con el fin de modificar propiedades químicas o catalíticas, provocar cambios de especificidad de sustratos, realizar estudios de desplegamiento-replegamiento, de la presencia de cosolventes o cosolutos, etc.. Además, en muchos casos es posible la *elección del soporte* adecuado según el precio, el tipo de reactor o la capacidad de carga enzimática deseados.

Sin embargo cada tipo de enzima y cada reacción a catalizar presentaran condicionantes específicos al establecimiento de estrategias generales de inmovilización covalente, surgiendo problemas de congruencia geométrica enzima-soporte, los cuales limitarían la posibilidad de multiinteracción y de estabilización adicional, el número de uniones de cada molécula de enzima con el soporte podría provocar distorsiones y conducir a derivados enzimáticos inactivos, o bien, algún grupo del centro activo imprescindible para su actividad catalítica podría participar en la unión al soporte, lo cual supondría la inactivación de la enzima.

#### ► Inmovilización covalente de enzimas sobre *soporte glioxil-agarosa*

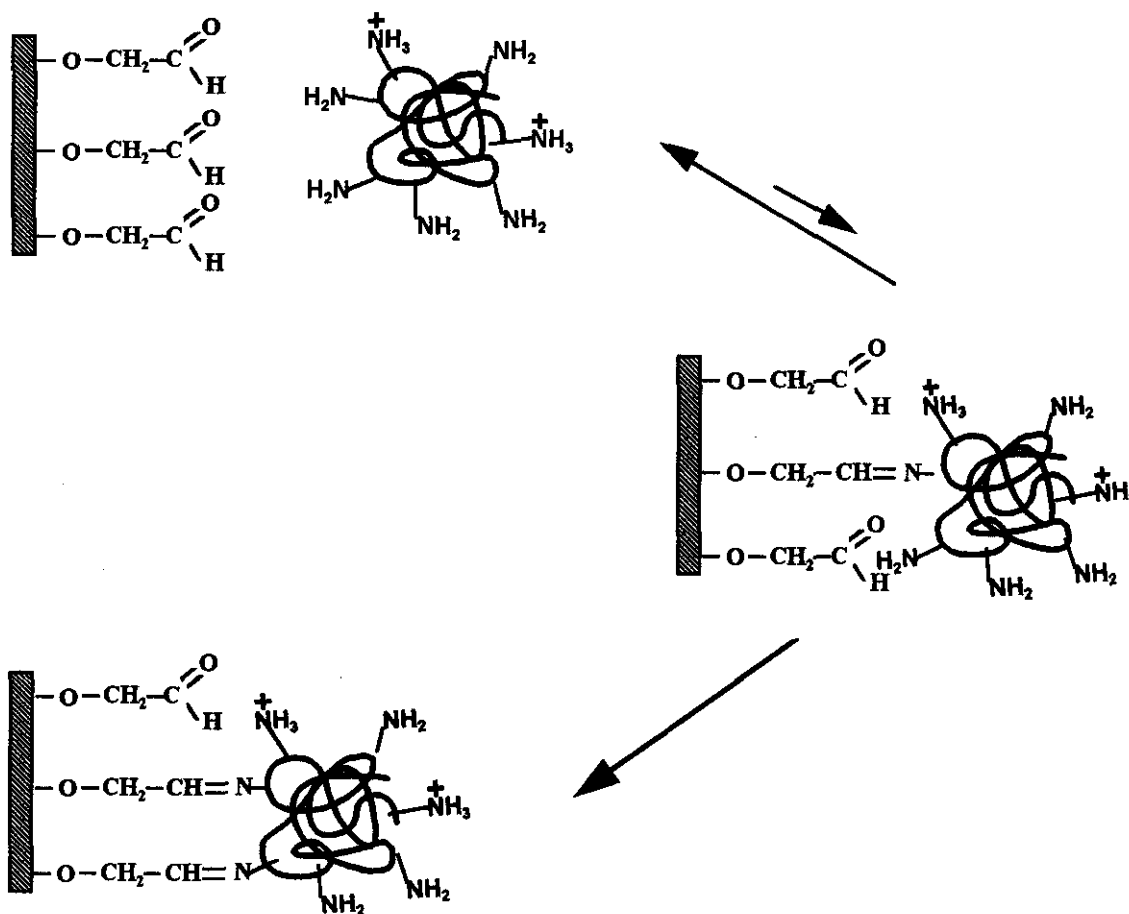
Este método consiste en la inmovilización covalente controlada y poco distorsionante de enzimas sobre un soporte sólido preexistente tipo *superficie* polifuncionalizado con grupos *aldehído* moderadamente separados del soporte (7, 8).

El proceso de inmovilización se inicia con el ataque nucleofílico del N de un residuo de Lys superficial de la enzima sobre el C carbonílico de uno de los grupos

*glioxilo* con los que se encuentra activado el soporte, dando lugar a una *base de Schiff*. Esta *base de Schiff* es una forma reversible y por ello será necesaria la posterior reducción con  $\text{NaBH}_4$  para que resulte un enlace covalente sencillo y por tanto estable entre enzima y soporte. Esta reducción, además provoca el bloqueo o inactivación del soporte, por convertir los grupos *glioxilo* reactivos remanentes en grupos *hidroxilo* inertes.

Las características más importantes tanto del tipo de grupo reactivo como del tipo de unión enzima-soporte se resumen a continuación. En primer lugar, los geles de agarosa son estructuras tridimensionales más o menos compactas integradas por la asociación de filamentos de cadenas polisacáridas organizadas, cada uno de estos filamentos de gran densidad exhibe una gran superficie ante una enzima, posibilitando una buena congruencia geométrica entre ambas. El método de activación permite el fácil control del grado de activación superficial y con ella se puede conseguir una elevada densidad superficial de grupos activos accesibles en el soporte. Estos grupos reactivos obtenidos son muy estables tanto durante el almacenamiento prolongado como en el transcurso de la reacción de inmovilización de proteínas. El grupo con el que se ha activado el soporte, grupo *glicol*, presenta gran reactividad hacia un grupo químico abundante sobre la superficie de las proteínas como es el grupo *amino* de los residuos de *Lys* y la interacción entre ellos no presenta ningún impedimento de tipo estérico. El resultado del proceso es la formación de un enlace reversible tipo *base de Schiff*, esto es muy importante pues los enlaces que se formarán mayoritariamente serán aquellos que supongan la mínima distorsión de la estructura tridimensional de la enzima, siempre que las condiciones de reacción no sean muy drásticas. Cuando la densidad de grupos reactivos sobre cada una de las especies (soporte y enzima) es suficiente para que puedan tener lugar varias interacciones sobre la misma molécula, la formación de dos enlaces tipo *base de Schiff* entre ellos supone la inmovilización irreversible a pesar de la reversibilidad de cada uno de estos enlaces, pues la probabilidad de que los equilibrios de disociación de ambos enlaces se encuentren en el mismo instante desplazados hacia forma disociada son muy bajas (Figura 0.2). El tratamiento posterior con un agente reductor como el  $\text{NaBH}_4$  no sólo supone la irreversibilidad de los enlaces formados sino la inactivación de los grupos reactivos del soporte que no hubieran interaccionado, que pasan a convertirse en *hidroxilos*, lo cual supone la obtención de un derivado enzimático inmovilizado en el que la enzima se encuentra unida covalentemente a un soporte sólido inerte.

Estas características confieren al sistema de inmovilización buenas posibilidades de que entre enzima y soporte tengan lugar una interacción intensa, a través de varios puntos, pero poco distorsionante, y prometen una inmovilización rápida, extensible a todo tipo de enzimas y duradera, como lo demuestra la aplicación a enzimas tan diferentes como la lipasa de *Candida rugosa* (9), tripsina (8), quimotripsina (10), penicilina G acilasa (11), ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductasa (12), etc. que han dado lugar a derivados con una alta carga enzimática e importante estabilización.



## 1.2. UTILIZACION DE ENZIMAS EN INDUSTRIA LACTEA

La aplicación de enzimas para la industria del procesamiento de alimentos líquidos ha avanzado rápidamente debido a que los procesos de la industria alimentaria en general son degradativos y en muchos de ellos la industria tradicional ya utilizaba

extractos enzimáticos, por lo tanto la introducción de nuevas tecnologías supone la adaptación de los procesos utilizando la misma herramienta (biocatalizador).

La industria láctea ofrece un campo muy interesante para la utilización de enzimas inmovilizadas en el procesamiento de sus productos o en su análisis. Muchos de los procesos que se realizan hoy en día requieren el uso de enzimas que en la actualidad se usan en forma de extractos solubles con los problemas económicos, técnicos y de posibles contaminaciones que ello conlleva, por tanto la utilización de derivados enzimáticos inmovilizados sobre los numerosos derivados lácteos fluidos supondría interesantes oportunidades tanto por la posibilidad de substituir las etapas enzimáticas clásicas por sistemas en continuo, como por la posibilidad de introducir nuevos tratamientos enzimáticos que den lugar a nuevos productos y de mayor calidad. Desde que ha sido planteada esta posibilidad se han estudiado numerosas reacciones de interés potencial:

- Utilización de *catalasa* inmovilizada para la degradación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) usado en la esterilización de la leche en frío.
- Utilización de *peroxidasa* inmovilizada como agente antimicrobiano.
- Utilización de *papaína* inmovilizada para el estudio de la estructura de las micelas.
- Utilización de *proteasas* inmovilizadas para la coagulación de la leche.
- Utilización de  $\beta$ -*galactosidasas* inmovilizadas para la hidrólisis de lactosa.
- Utilización de *lipasas* y *esterasas* inmovilizadas para la producción de aromas naturales.

\* \* \*

Dos de las enzimas para las que sería de gran interés su inmovilización para el empleo de los derivados en la industria láctea son: *renina* y  $\beta$ -*galactosidasa*.

Las *reninas* son proteasas ácidas que catalizan la hidrólisis de una única proteína láctea, la caseína  $\kappa$ , lo cual desencadena una cadena de procesos que culminan con la formación de un precipitado denominado *cuajada*, primera etapa en la producción del queso. Estas enzimas son de las más usadas hoy en día a nivel industrial y su adquisición supone grandes sumas de dinero para las industrias consumidoras. Por ello se han

realizado numerosos estudios para determinar el modo de utilización más eficiente. El desarrollo de las técnicas de inmovilización de enzimas ha orientado mucho de estos estudios a la investigación de las posibilidades de inmovilización impulsados por dos factores: el enorme incremento de la demanda que llevó a períodos en los que la disponibilidad de los extractos utilizados, principalmente *quimosina*, disminuía considerablemente y la laboriosidad y dificultad de control de proceso industrial. Por lo tanto, la obtención de derivados inmovilizados de estas enzimas permitiría el procesamiento en sistemas en continuo con el consiguiente ahorro en catalizador, además se facilitaría el control del proceso, se limitarían de reacciones secundarias sobre los productos de la coagulación o de menor especificidad que la hidrólisis de caseína, y se podrían obtener sueros libres de enzima (ricos en lactosa y en proteínas solubles) lo cual permitiría su aprovechamiento posterior.

Al tratarse de una endoproteasa y tener que actuar sobre un sustrato macromolecular la inmovilización puede plantear condicionantes de tipo estérico dando lugar a la pérdida de sus propiedades coagulantes. Por ello, la preparación de derivados presenta una mayor complejidad que la de otras enzimas cuyos sustratos son de pequeño tamaño.

Las  *$\beta$ -D-galactosidasas* ( *$\beta$ -D-galactósido galactohidrolasas*, EC 3.2.1.23) son disacaridasas que catalizan la hidrólisis y transgalactosilación de  $\beta$ -galactopiranosídeos. Su sustrato natural es la lactosa y por ello también son denominadas *lactasas*, siendo responsables de la hidrólisis de su enlace  $\beta$ -(1-4) rindiendo como productos: *galactosa* y *glucosa*. Son, por tanto, enzimas específicas para el anillo D-piranosídeo y el enlace  $\beta$ -glicosídico.

El interés industrial de estas enzimas reside en la posibilidad de su utilización para la eliminación de la lactosa en numerosos productos y subproductos lácteos.

La lactosa (4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glucosa) es el azúcar mayoritario de la leche y su presencia en los productos lácteos supone importantes limitaciones a la hora de su manipulación o del consumo humano de los productos. En primer lugar, la insuficiencia enzimática intestinal que presenta una sub-población de individuos nada despreciable, hace que desarrollen intolerancia a la lactosa por lo que, en muchos casos, no pueden consumir leche ni sus derivados. En segundo lugar, la baja solubilidad de este disacárido limita considerablemente muchos de los posibles tratamientos a aplicar sobre



los productos lácteos, dificultando y encareciendo los procesos industriales. Y en tercer lugar, la presencia de lactosa en los sueros supone un importante contaminante de las aguas residuales de las plantas procesadoras de leche.

La aplicación de estas enzimas en la industria láctea, además de eliminar los citados inconvenientes derivados de la presencia de este componente en los productos elaborados, supondría un atractivo modo de aprovechamiento de los sueros como jarabes de glucosa y galactosa que podrían ser utilizados como edulcorantes en productos propios o en diferentes industrias alimentarias. También permitiría introducir modificaciones en los procesos lo cual daría lugar a derivados lácteos diferentes.

Las características estructurales y propiedades enzimáticas de cada  $\beta$ -galactosidasa dependen de su origen, por eso en cada capítulo del presente trabajo se hace una descripción breve de la lactasa objeto de estudio. Las diferentes lactasas han mostrado variadas propiedades cinéticas que condicionaran su posible aplicación en función de las propiedades del sustrato, de los rendimientos requeridos y de los condicionantes tecnológicos del proceso. Así, las enzimas de origen fúngico disponibles comercialmente, como *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* permiten buenos rendimientos en la hidrólisis de lactosa en suero debido a su pH óptimo ácido (pH 4,5) apropiado para este sustrato; para su utilización en la hidrólisis de lactosa en leche, se ha compensado su menor actividad enzimática a pH 6,0-6,5, utilizando cantidades mayores de enzima. También se han estudiado fuentes enzimáticas de tipo bacteriano como *Escherichia coli* o *Bacillus circulans* por tener un pH óptimo de actividad adecuado para su utilización en leche, sin embargo debido a su origen su aplicación en procesos alimentarios no es considerado "seguro" y por tanto su uso no está permitido.

El proceso de hidrólisis de lactosa se debe realizar preferentemente a temperaturas altas para eliminar problemas de contaminación bacteriana y para aumentar la velocidad de reacción pues es preciso procesar grandes cantidades de sustrato (leche o suero). Por ello, la obtención de *derivados enzimáticos óptimos* para su empleo a nivel industrial obliga a que éstos sean *muy activos y muy estables*. Esta estabilización podrá venir de la mano de la propia inmovilización o por el desarrollo posterior de estrategias de estabilización sobre los derivados inmovilizados.

\* \* \*

## **OBJETIVOS GENERALES**

## OBJETIVOS GENERALES

De un modo muy general, el primer objetivo de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de herramientas bioquímico-físicas para optimizar el diseño molecular de derivados de enzimas inmovilizadas útiles en tecnología de alimentos y más concretamente de derivados de una *renina* y de diferentes *lactasas* de interés en tecnología láctea. Sin embargo, al abordar dicho objetivo surgen dificultades, poco estudiadas en Tecnología Enzimática, y no exclusivas de la Tecnología de los Alimentos. Los problemas a resolver para diseñar buenos derivados de *renina* y *lactasa* se solapan perfectamente con otros, no los más comunes pero sí muy frecuentes, que se manifiestan en las enzimas de interés industrial, como son: la utilización de enzimas inmovilizadas que actúan sobre sustratos macromoleculares, la inmovilización y estabilización de enzimas altamente glicosiladas o la estabilización estructural y funcional de enzimas oligoméricas.

Así pues se decidió, en contraposición a la tecnología más común de enzimas sencillas que actúan sobre sustratos de bajo peso molecular y tomando como modelo las citadas enzimas de marcado interés industrial, fijar como objetivo primordial del trabajo: *la inmovilización y la estabilización de enzimas de estructura y/o función complejas*.

Como método de trabajo se continuó la línea de investigación clave en nuestro laboratorio para el desarrollo de nuevas tecnologías de enzimas industriales a través de la aplicación de estrategias de bioquímica y biofísica de fase sólida. Es decir, servirse de la inmovilización de la posterior modificación de los derivados resultantes, para el diseño de nuevos sistemas de estabilizar y modular las propiedades de las enzimas industriales.

Son tres los problemas a resolver y a ellos se dedica cada uno de los tres capítulos de la Memoria:

- i.- *Inmovilización de enzimas/proteínas que actúan sobre sustratos/ligandos macromoleculares.*
- ii.- *Inmovilización y estabilización de enzimas altamente glicosiladas.*
- iii.- *Inmovilización y estabilización estructural y funcional de proteínas de estructura oligomérica.*

En cada uno de los capítulos se discuten las nuevas metodologías a utilizar y en la Discusión Global se realiza una evaluación conjunta ya que, a pesar de los diferentes temas planteados, el núcleo de los problemas y las herramientas para resolverlos tienen numerosos puntos en común. El problema global es la inmovilización de una enzima para ser reutilizada sin que las moléculas se liberen del soporte, al mismo tiempo retener un gran porcentaje de actividad catalítica, tanto hacia sustratos pequeños como hacia sustratos macromoleculares, y aumentar su estabilidad cuanto sea posible frente a la disociación de subunidades, frente a la distorsión de la estructura 3D, etc.. Las soluciones vendrán de la mano de la elección de las estrategias adecuadas, de la elección del soporte para la inmovilización, de la elección de la química de activación, de la utilización de brazos espaciadores, de la elección de los agentes entrecruzantes, del diseño de los procesos de inmovilización y de modificaciones químicas, etc..

\* \* \*

# **CAPITULO I**

**Inmovilización de enzimas que actúan sobre  
substratos macromoleculares: Inmovilización de renina  
de *Mucor miehei* para la hidrólisis de caseína  $\kappa$ .**

## INTRODUCCION

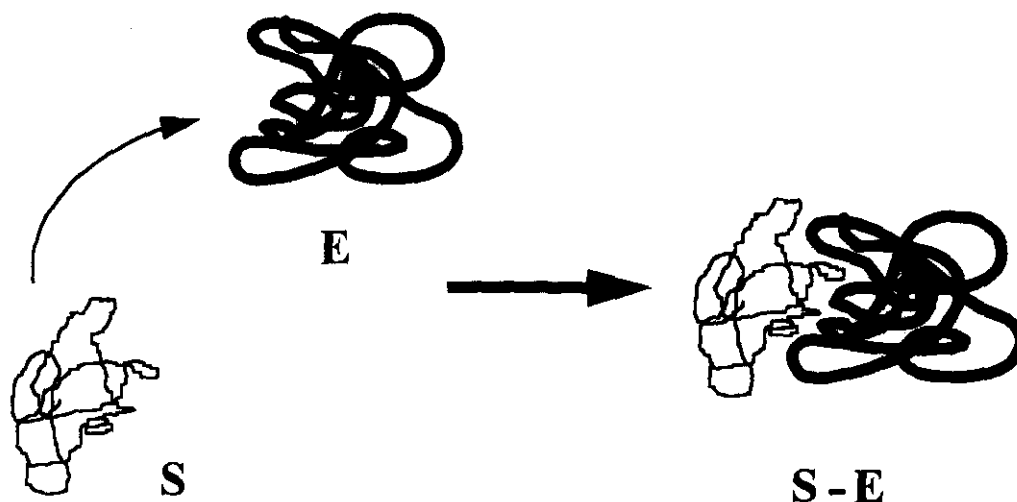
### 1. INMOVILIZACION DE PROTEINAS/ENZIMAS QUE ACTUAN SOBRE LIGANDOS/SUBSTRATOS MACROMOLECULARES

La inmovilización de enzimas y otras proteínas de interés que una vez en fase sólida deben actuar sobre sustratos macromoleculares supone un problema general tanto para el desarrollo de técnicas de cromatografía como para reacciones industriales. Este es el caso de la inmovilización de *antígenos* para unión específica del correspondiente anticuerpo, de *nucleasas* para hidrólisis de ácidos nucleicos, de *lectinas* o, como en el caso que se ha elegido como ejemplo, de *proteasas* como la *renina* (39.000 D) para la hidrólisis de caseína  $\kappa$  (19.000 D), en los cuales la zona de la superficie de la enzima involucrada en el reconocimiento del sustrato y en la catálisis debe ser muy amplia (Figura I.1). Ello trae consigo dos problemas críticos en el proceso de inmovilización:

- por un lado, pequeñas distorsiones en la estructura tridimensional de la enzima que se pueden producir durante el proceso de inmovilización, por la unión covalente multipuntual, por interacciones físico-químicas entre la enzima y el soporte, etc. pueden tener ahora efectos negativos muy importantes sobre las propiedades catalíticas de la enzima inmovilizada.

- por otro lado, la posibilidad de que tras la inmovilización de la enzima su centro activo pueda quedar parcialmente orientado hacia la superficie del soporte, impondría severas restricciones para el acceso de los sustratos macromoleculares.

Estos problemas han recibido poca atención en la literatura científica ya que en la mayoría de los sistemas enzimáticos de interés industrial las enzimas deben actuar sobre sustratos pequeños y la incidencia de los problemas planteados es mucho menor.



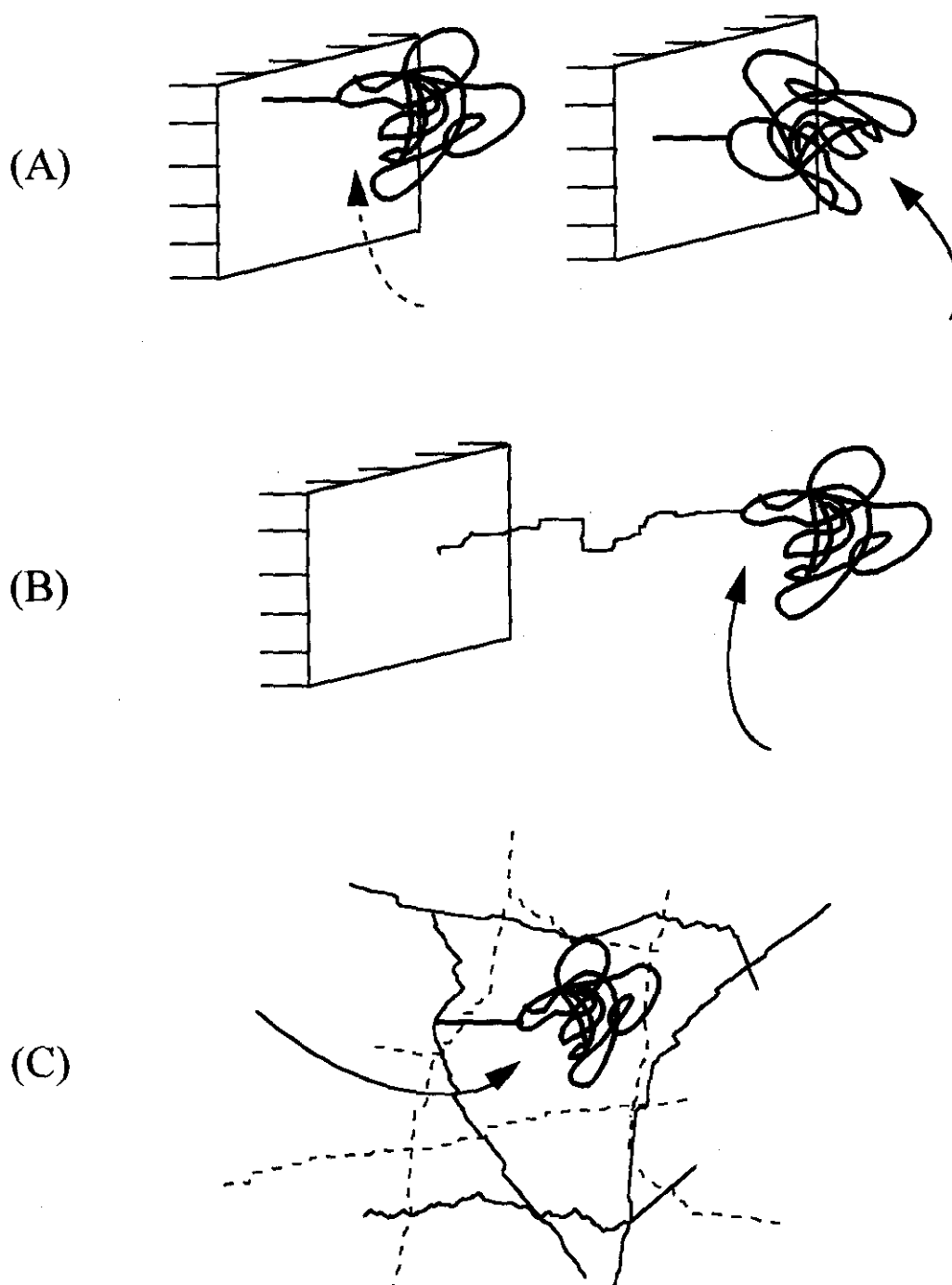
**Figura I.1.** Representación esquemática de la interacción de una enzima con un sustrato macromolecular.

Así pues, para optimizar la preparación de estos derivados de proteínas que actúan frente a sustratos macromoleculares, en la presente Memoria de Tesis Doctoral se ha estudiado la influencia de algunas características, tanto del soporte como de los métodos de activación de los mismos que, en este caso pueden ser críticas. Así:

- \* se inmovilizará la enzima sobre soportes activados con diferentes grupos funcionales para forzar la unión de las moléculas de proteína al soporte a través de diferentes zonas de su superficie externa. De este modo se pretende modificar la orientación relativa del centro activo de la enzima con respecto a la superficie del soporte, hasta lograr una orientación en la cual no se vea restringida la accesibilidad de los sustratos voluminosos,

- \* se inmovilizará la enzima sobre soportes activados en los que los grupos funcionales reactivos se encuentren alejados de la matriz del soporte por medio de "brazos espaciadores" inertes,

- \* y, por último, se inmovilizará la enzima sobre soportes con morfología interna diferente que supongan menor impedimento estérico.



**Figura 1.2.** Estrategias de inmovilización propuestas para la inmovilización de enzimas que actúan sobre sustratos macromoleculares: (A) Anclaje de la enzima al soporte con distintas orientaciones relativas, (B) Utilización de soportes activados con "brazos espaciadores" y (C) Utilización de soportes con diferente morfología interna.



\* en general, se diseñarán inmovilizaciones muy suaves para reducir al máximo las distorsiones de la enzima durante la inmovilización y para conservar lo más intacta posible toda la zona involucrada en el reconocimiento de los substratos macromoleculares. Es decir, utilizando soportes con un bajo grado de activación, se intentarán reducir al máximo las posibilidades de que cada molécula de enzima se pueda unir al soporte a través de varios enlaces. Al mismo tiempo, cuando la inmovilización requiera algún tipo de modificación química previa de la enzima (la activación de sus residuos ácidos, la oxidación de sus cadenas glicosídicas con peryodato, etc.) se emplearán los soportes con los grupos funcionales adecuados para que el grado requerido de modificación de la proteína sea lo menor posible.

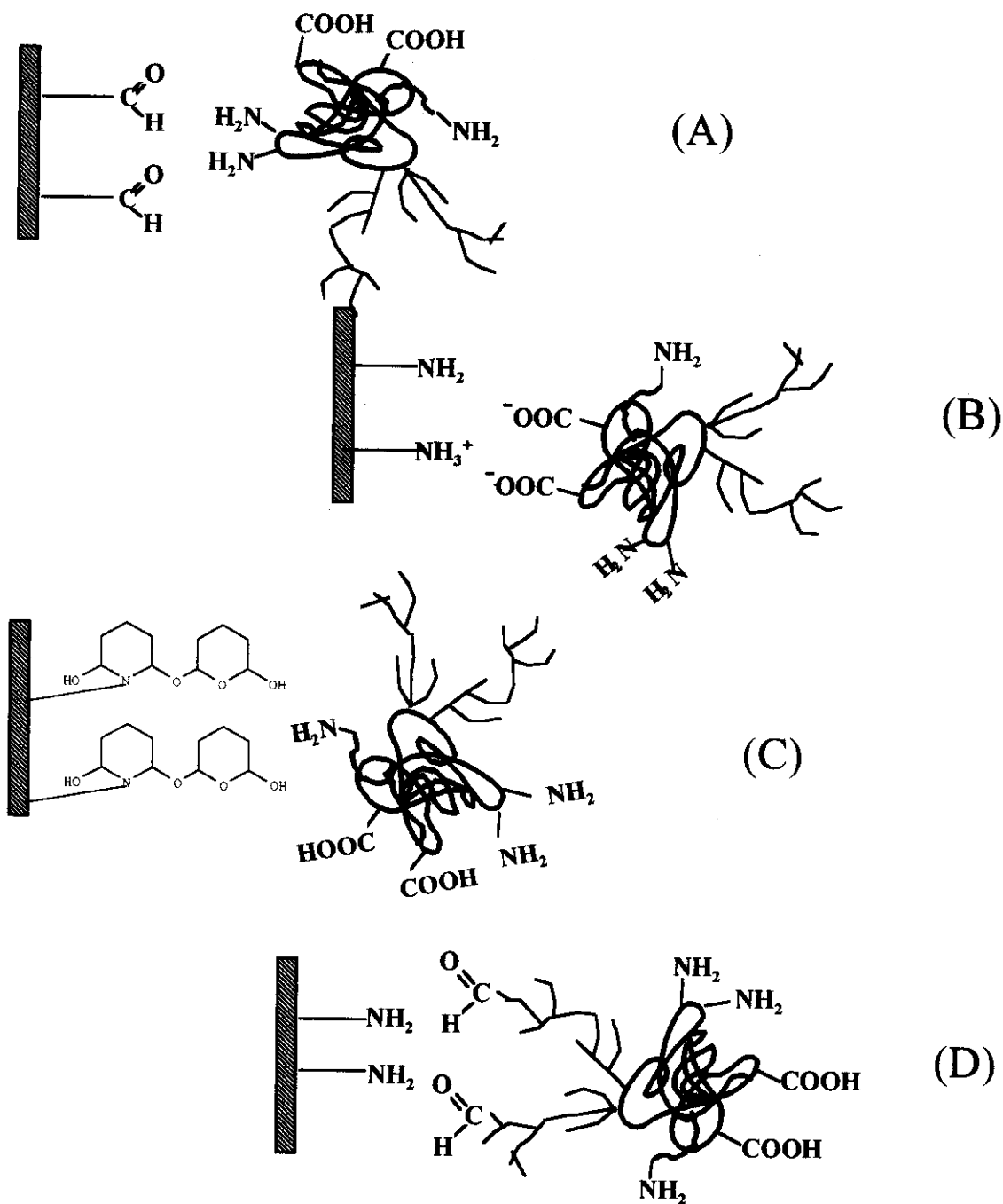
\* \* \*

A continuación se comentan en detalle las distintas alternativas propuestas para estudiar cada uno de los parámetros indicados y la orientación dada a su desarrollo. Estas tres estrategias no son en modo alguno excluyentes, pudiendo ser utilizadas de forma complementaria para abordar el problema de la obtención de derivados enzimáticos con buena actividad catalítica frente a substratos macromoleculares.

#### **\* ANCLAJE DE LA ENZIMA AL SOPORTE CON DISTINTA ORIENTACION RELATIVA.**

Este estudio utiliza un mismo soporte, variando el tipo de grupos reactivos con los que se activa, de forma que la unión de la enzima tenga lugar a través de grupos superficiales de diferente naturaleza. Con ello se intenta que la orientación mayoritaria que adoptarán las moléculas inmovilizadas para cada funcionalización suponga una diferencia llamativa con respecto a la mayoritaria con otro tipo de activación.

Se han desarrollado cuatro métodos de inmovilización que se representan graficamente en la figura I.3:



**Figura I.3.** Métodos de inmovilización de enzimas por unión covalente a soportes de agarosa que permiten la diferente orientación de la molécula con respecto a la superficie del soporte: (A) Inmovilización covalente a través de la zona de la enzima más rica en grupos *amino*; (B) Inmovilización covalente a través de los grupos *carboxilo* de la enzima; (C) Inmovilización covalente a través del residuo *amino terminal* de la enzima y (D) Inmovilización covalente a través de las cadenas glicosídicas de la glicoenzima.

- *Inmovilización de enzimas a través de su area más rica en grupos amino a soportes activados con grupos glioxilo (A).* Los grupos *aldehído* del soporte al reaccionar con un grupo *amino* superficial de la proteína forman *bases de Schiff*, lo cual supone la insolubilización reversible. Para que la unión enzima-soporte sea estable, en la interacción han de estar involucrados al menos dos pares *amino-aldehído*. La reacción bipuntual ha de tener lugar sobre un soporte muy activados y en un medio suficientemente alcalino ( $\text{pH} \geq 10,0$ ). Con esta estrategia las moléculas de enzima se inmovilizarán por la zona de su superficie que presente mayor densidad de residuos de *Lys* ya que serán los que más fácilmente puedan dar lugar a este tipo de inmovilizaciones bipuntuales.

- *Inmovilización de enzimas a través de sus grupos carboxilo a soportes activados con grupos amino (B).* La posibilidad de preparar un soporte activados con grupos *amino* de muy bajo pK permite realizar la inmovilización en condiciones experimentales muy suaves utilizando bajas concentraciones de carbodiimida como agente activador de grupos *carboxilo* de *Asp* o *Glu*. Por ello la enzima se inmovilizará mayoritariamente a través de la zona de su superficie de la enzima más enriquecida en este tipo de residuos ácidos.

- *Inmovilización de enzimas a través de sus residuos amino terminales a soportes activados con grupos glutaraldehído (C).* Estos soportes reaccionan irreversiblemente con las moléculas de proteína de modo que éstas quedan insolubilizadas nada más producirse la primera reacción entre un grupo *amino* superficial de la proteína y un residuo *glutaraldehído* del soporte. Si se tiene en cuenta que el pK de los grupos *amino terminales* de una proteína es de 7,5-8,0 y, por el contrario, el pK de los residuos de *Lys* expuestos al medio del orden de 10,7, se puede preveer que la reactividad del residuo *amino terminal* a pH 7,0-8,0 es muy superior a la de cada residuo de *Lys*. Por ello, cuando se inmoviliza una proteína a pH próximo a la neutralidad sobre este tipo de soportes, la reacción entre cada molécula de enzima y el soporte va a tener lugar principalmente a través de este residuo *amino terminal*, siempre y cuando se encuentre accesible en la superficie de la molécula.

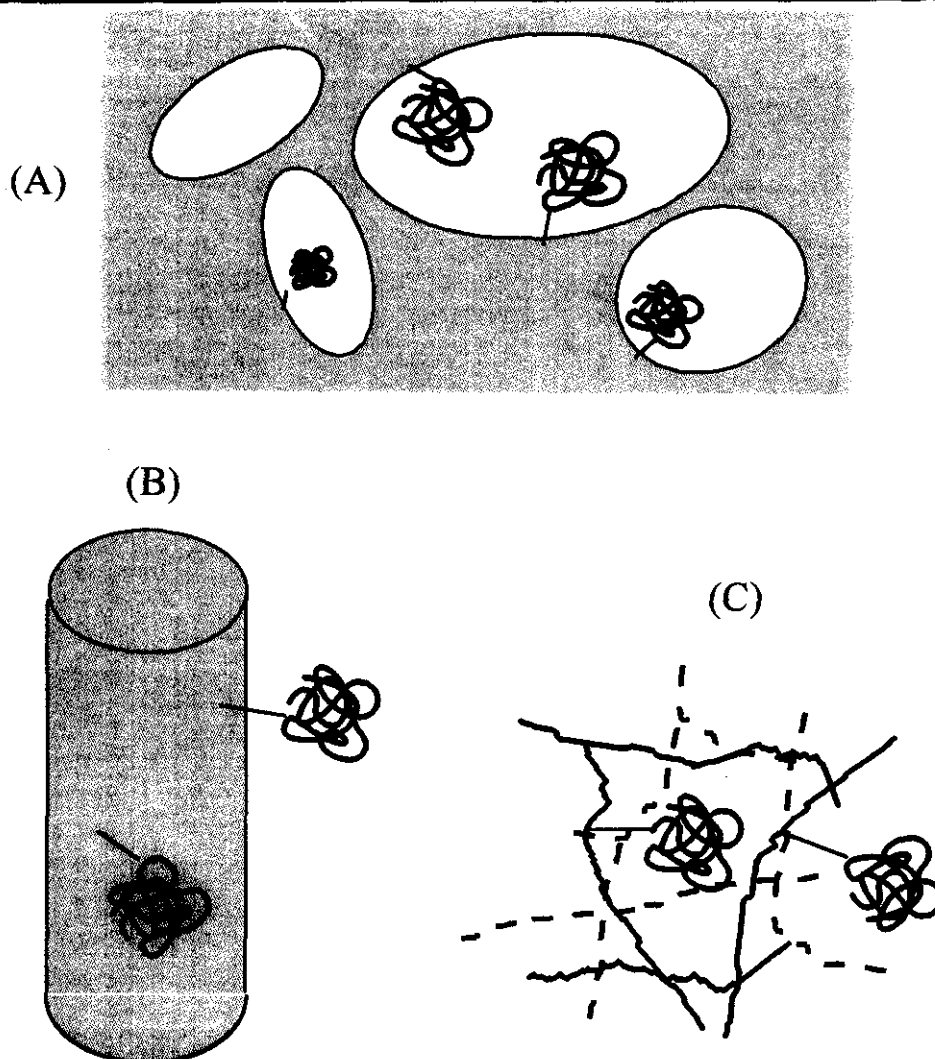
- *Inmovilización de enzimas a través de sus cadenas glicosídicas a soportes activados con grupos amino (D)*. En el caso de enzimas o proteínas glicosiladas la presencia de sus cadenas polisacáridas permite un nuevo tipo de inmovilización. El bajo pK de los soportes MANA-agarosa ha posibilitado la insolubilización de glicoproteínas, previamente oxidadas, en condiciones suaves.

#### **\* UTILIZACION DE "BRAZOS ESPACIADORES".**

La utilización de brazos espaciadores entre ligandos y soporte se desarrolló principalmente en cromatografía de afinidad para lograr que el ligando en fase sólida pudiese interaccionar con el centro de reconocimiento de las proteínas, generalmente situado en una cavidad, más o menos expuesto. En estos casos las cadenas alifáticas de 6-9 átomos de carbono suelen ser suficientes para lograr un perfecto acoplamiento entre el ligando inmovilizado y la proteína en solución. En el caso de enzimas y substratos macromoleculares, el problema podría ser mucho más complejo ya que un distanciamiento de pocos Å promovido por "brazos espaciadores alifáticos" podría no ser suficiente cuando la orientación de la molécula de enzima en relación al soporte no sea buena para la inserción del substrato voluminoso. Por ello se han propuesto la utilización de dos tipos de espaciadores un diepoxido lineal de 12 átomos, y cadenas polialdehídicas obtenidas por oxidación de dextrano.

#### **\* UTILIZACION DE SOPORTES CON DIFERENTE MORFOLOGIA INTERNA.**

La naturaleza química del soporte así como el método de síntesis industrial del mismo, determinarán la disposición estructural de las cadenas poliméricas que lo componen, dando lugar a estructuras porosas más o menos abiertas (Figura I.4). La morfología interna del soporte determinará el tipo de "conexiones" geométricas enzima-soporte que surjan en la inmovilización: interacciones enzima-cadena molecular, enzima-red tridimensional, enzima-superficie o situaciones intermedias. La elección de un tipo u otro de soporte será decisiva pues la congruencia geométrica enzima soporte determinará la accesibilidad del substrato voluminoso promovido por la proximidad entre la superficie del soporte y el centro activo de la enzima.



**Figura I.4.** Soportes con diferente morfología interna.

Así, los soportes con poros cilíndricos como sílica, vidrio, alumina, algunos polímeros sintéticos como las resinas SEPABEADS de la casa Mitsubishi, etc. (A) o los soportes tipo agarosa o celulosa constituidos por fibras de unos 200 Å de diámetro (B) podrían presentar una gran congruencia con la enzima inmovilizada y dificultar su interacción con sustratos voluminosos. Sin embargo, muchos polímeros sintéticos obtenidos por entrecruzamiento químico de cadenas poliméricas aisladas como las resinas de tipo acrílico o de tipo polivinilo presentan una estructura interna porosa similar a un entramado de cadenas moleculares aisladas (C) y la inmovilización de moléculas de enzima podría presentar menores problemas estéricos para la unión de los sustratos (Figura I.4).

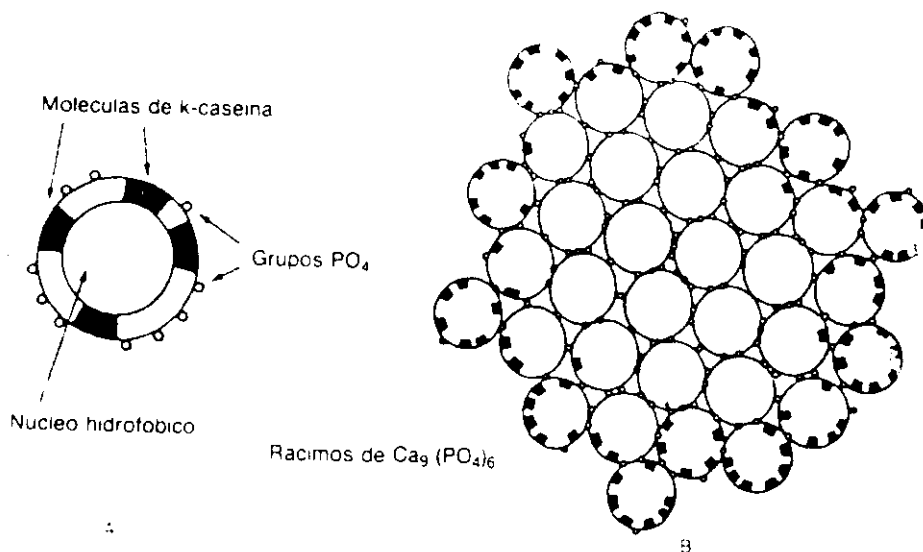
## 2. RENINA, ENZIMA-MODELO PARA EL DESARROLLO TECNICAS DE INMOVILIZACION DE ENZIMAS QUE ACTUAN SOBRE SUBSTRATOS MACROMOLECULARES

### 2.1. COAGULACION DE LA LECHE: ESTABILIDAD MICELAR, MECANISMO DE LA COAGULACION Y ENZIMAS COAGULANTES

La *coagulación* de la leche consiste en la formación de un entramado proteico (coágulo o cuajada), producto de las modificaciones fisicoquímicas de las micelas de caseína por la acción de enzimas proteolíticas y/o acidificación, y supone la primera etapa del proceso de transformación de la leche en queso a la que siguen la *separación del suero* (fracción soluble) para obtención de la cuajada (precipitado), el *salado*, y el *afinado o maduración*, que recoge todas las transformaciones bioquímicas que se producen sobre los constituyentes de la cuajada por la acción enzimas, en general de origen microbiano.

La micela de caseína está formada por la asociación de proteínas (caseínas:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ ), de fragmentos peptídicos y de constituyentes inorgánicos (*Ca* y *P*). Las características físicas de estas partículas (volumen, densidad, grado de hidratación) les confieren gran estabilidad en medio acuoso.

Entre las caseínas, destaca la fracción  $\kappa$  por su escasa afinidad al *Ca*, por ser la única que puede encontrarse glicosilada, pero sobre todo, por su importante papel dentro del complejo micelar (13). La estructura primaria de su cadena peptídica revela la existencia de dos regiones: la región *N-terminal* (segmento peptídico 1-105), básica e hidrofóbica, y la región *C-terminal* (segmento polipeptídico 106-169), cuyo carácter ácido e hidrofílico se ve acentuado por la presencia de las cadenas glicosídicas. La presencia de la caseína  $\kappa$  en la micela es la que permite la formación de complejos estables con las caseínas  $\alpha$  y  $\beta$  debido precisamente a su naturaleza anfipática: el núcleo de la micela se encuentra formado por intensas asociaciones poliméricas de naturaleza exclusivamente proteica con bajo contenido en caseína  $\kappa$ , unidas entre sí por enlaces hidrofóbicos y electrostáticos en los que participarán los grupos *fosfoserilo* de la proteínas y el *Ca*. Por el contrario, en la zona externa de la micela se dispondrán las subunidades ricas en caseína  $\kappa$ , que actuarán estabilizando el complejo, exponiendo al medio su región *C-terminal* hidrofílica (14) (Figura I.5).



**Figura I.5.** Representación esquemática de la estructura propuesta para las micelas (14): (A) subunidad micelar y (B) micela.

La gran estabilidad de la leche como coloide es consecuencia de la carga eléctrica superficial negativa de las micelas, cuya repulsión electrostática evita la agregación, a pesar de la gran densidad, manteniendo la dispersión micelar.

\* \* \*

A pesar de la gran estabilidad de la micela de caseína, la alteración de alguno de los parámetros que controlan su dispersión en el medio provoca la insolubilización de la fracción proteica de la leche o **coagulación**. Los métodos más sencillos para desestabilizar la dispersión son:

- la **acidificación** del coloide, que provoca el aumento de la solubilidad del  $\text{Ca}$  en la fase acuosa, con la consecuente desmineralización de la micela, así como la disminución de la ionización de las caseínas y, como resultado, la disminución de su capacidad de complejación,

- y la **acción de enzimas proteolíticas** que actúan sobre las proteínas micelares provocando la desestabilización y ruptura del complejo micelar.

Aunque existe un gran número de proteasas capaces de deshacer el complejo caseínico, las más interesantes son aquellas que, por su especificidad, permiten la obtención de un adecuado precipitado sólido o cuajada. El coagulante más utilizado y

estudiado ha sido el *cuajo* o "rennet", extracto enzimático obtenido del estómago de ternero cuyo componente enzimático mayoritario es la *quimosina* o *renina* <sup>1</sup> aunque puede contener en pequeña cantidad *pepsina bovina* (15-17). La renina es la proteasa ácida que actúa específicamente sobre  $\kappa$ -caseína.

Todos los coagulantes adecuados como substitutos del cuajo para la fabricación de queso contienen una enzima perteneciente a las proteasas ácidas, denominadas en general "*reninas*" (EC 3.4.23 ó EC 3.4.4.3). Tanto las enzimas secretadas en forma de zimógenos por las células del estómago de vertebrados, como las de origen microbiano secretadas al medio en su forma activa, muestran una considerable homología estructural, así como similares mecanismos catalíticos (18). Sus pesos moleculares oscilan entre 30.000 y 40.000 D, y muestran especificidad hacia la hidrólisis del enlace *Phe*<sub>105</sub>-*Met*<sub>106</sub> de caseína  $\kappa$  (19), aunque posteriormente podrán participar en hidrólisis menos selectivas.

\* \* \*

El estudio de la coagulación por acción del cuajo ha permitido entenderla como un proceso en dos fases. La primera fase o *fase enzimática* en la que tiene lugar la hidrólisis selectiva del enlace peptídico *Phe*<sub>105</sub>-*Met*<sub>106</sub> de la caseína  $\kappa$ . Como productos se obtienen el *caseinomacropéptido*, correspondiente al segmento 106-169, soluble en el suero y la *paracaseína*  $\kappa$  de marcado carácter hidrofóbico que, al contrario de lo que ocurre con la caseína  $\kappa$ , ya no es capaz de estabilizar al complejo caseínico en presencia de *Ca*. La segunda fase es la *de coagulación* propiamente dicha, que consiste en el desplegamiento de las cadena polipeptídicas, consecuencia de la solubilización de la zona hidrofílica de la caseína  $\kappa$ , que deja expuesto al medio el interior hidrofóbico del complejo micelar.

El resultado final de todo el proceso es la desestabilización del sistema

---

<sup>1</sup>El término "*renina*", utilizado para denominar a la citada enzima coagulante láctea ("*rennin*", en inglés) puede llevar a confusiones debido a que coincide con el dado a otra enzima sin ninguna relación como es la producida en el riñón que desempeña una importante función en el mantenimiento de la tensión sanguínea ("*renin*"). Por ello Foltmann propuso el nombre de "*quimosina*" ("*chymosin*"), introducido por Deschamps en 1940.

Foltmann, B. (1970) en "*Methods in Enzymology*". (Ed. Perlmann, G.E. y Lorand, L.) Accademic Press, vol. XIX, 421-436.

Deschamps, J.M. (1940). *J. Pharmacie et Sciences Accesories, París*, 6, 412-420.



inicialmente homogéneo y la formación de dos fases una acuosa o *suero* en la que permanecen solubles sales, azúcares y algunas proteínas y péptidos y un precipitado o *cuajada* mayoritariamente proteico.

Aunque en la mayoría de las condiciones la hidrólisis de caseína  $\kappa$  y la coagulación tienen lugar prácticamente solapadas en el tiempo, es importante remarcar que la coagulación no es la consecuencia directa de la hidrólisis de caseína  $\kappa$ , sino de las interacciones entre las proteínas cuando no se encuentran en equilibrio con el medio. Por ello existen determinadas condiciones en la que el medio es capaz de estabilizar las cadenas proteicas altamente hidrofóbicas evitando su precipitación. El incremento del pH por encima de 6,5, la disminución de la temperatura por debajo de 15°C o la reducción de la concentración de *Ca* evitan la coagulación a pesar de que la etapa enzimática haya tenido lugar en las citadas condiciones.

## 2.2. UTILIZACION DE DERIVADOS INMOVILIZADOS DE RENINA

A pesar de lo complejo del proceso de coagulación de la leche, la posibilidad de separar en el tiempo la etapa enzimática de la de coagulación propiamente dicha, convierte al proceso en susceptible de la utilización de derivados inmovilizados de enzimas. Así, tratando la leche a menos de 15°C con el derivado enzimático tiene lugar exclusivamente la hidrólisis enzimática y el simple calentamiento provoca de forma inmediata la coagulación, siempre que el rendimiento de la etapa anterior haya sido suficiente (Figura I.6).

Desde el punto de vista industrial, la utilización de derivados enzimáticos inmovilizados en la producción de queso ofrece dos ventajas muy importantes: permitir la separación del catalizador de la mezcla de reacción en cualquier momento y evitar que la enzima permanezca en el producto de la reacción. De este modo:

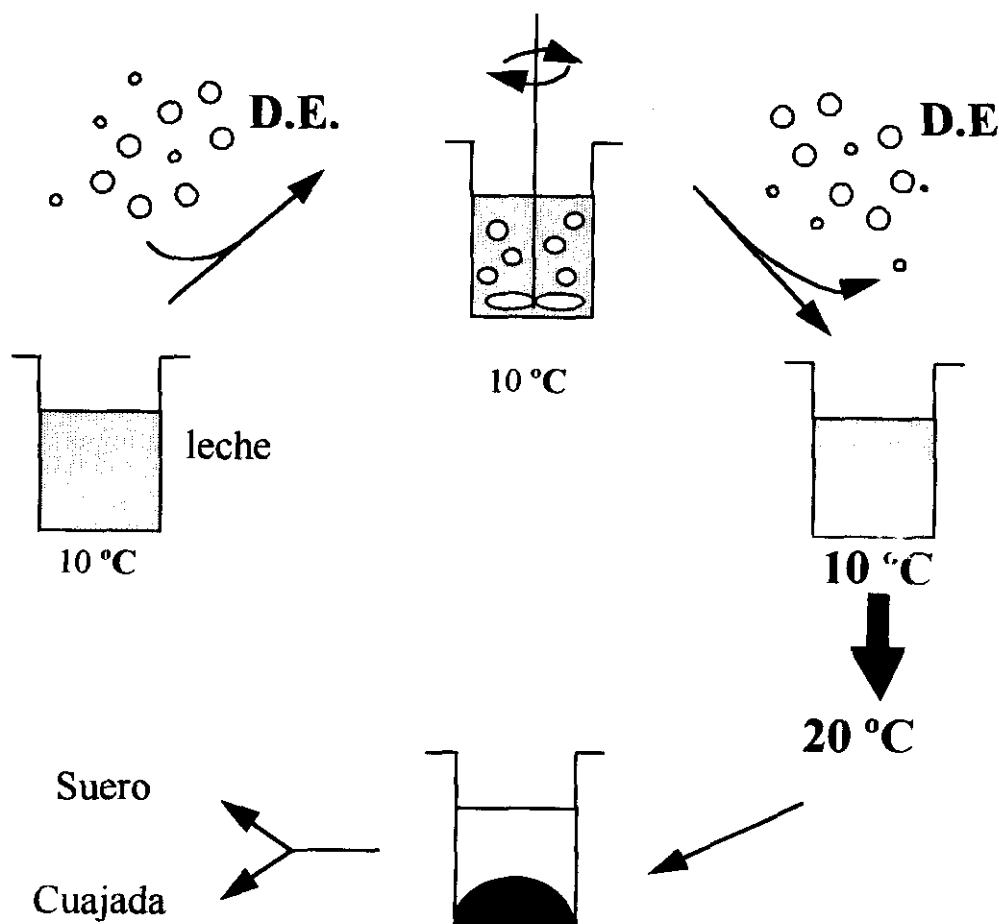
- se puede ejercer un mejor control de la fase inicial del proceso de coagulación pues, al alterar el tiempo que dure la proteolisis, se puede modificar el grado de proteolisis inicial de la leche previa a la coagulación, factor importante en el rendimiento de la cantidad de cuajada por litro de leche,

- se facilita el control del proceso posterior de afinado del queso, pues la ausencia del cuajo en el coágulo evita proteolisis no específicas,

- permite obtener lactosueros libres de proteasas, cuya presencia dificulta el procesamiento de estos productos secundarios para su posterior reutilización en alimentación animal, para enriquecer otros productos lácteos o para el aprovechamiento de los componentes disueltos en él (lactosa, péptidos solubles, etc.).

- se abaratan los costes de producción, ya que permite la reutilización de los catalizadores al ser recuperados de la mezcla de reacción por filtración o centrifugación, o bien la posibilidad de realizar la primera fase del proceso en continuo con lo cual se simplifica enormemente la producción.

En definitiva, la utilización de derivados inmovilizados de estas enzimas facilita la estandarización de la producción y la homogeneización de las propiedades organolépticas de los productos, permitiendo la reutilización del biocatalizador.



**Figura I.6.** Sistema propuesto para la coagulación de leche utilizando un derivado enzimático inmovilizado: D.E. = Derivado Enzimático.

### 2.3. RENINA DE *Mucor miehei*

Son las enzimas fúngicas de *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* o *Endothia parasitica* las que presentan propiedades comparables o incluso mejores que las del propio cuajo (14). Al comparar el extracto enzimático obtenido del cultivo de *Mucor miehei* con el cuajo se pueden citar que:

- el extracto de *Mucor miehei* es más resistente que el cuajo al aumento de la temperatura, así como a la alcalinización del medio.
- la intensidad y la especificidad de la actividad proteolítica hacia las distintas caseínas son del mismo orden en ambos extractos.
- la distribución de la enzima entre cuajada y lactosuero es diferente: *Mucor miehei* mantiene mayor actividad residual en suero y el cuajo presenta mayor tendencia a permanecer en el precipitado.

La renina de *Mucor miehei* es una glicoproteína de peso molecular 34.000-39.000 D, con un 5,4% de azúcares de los cuales los monosácaridos mayoritarios son glucosa y galactosa (20). En su composición de aminoácidos 7 residuos corresponden a *Lys* y 42 y 15 respectivamente a *Asp* y *Glu*. Posee puentes disulfuro, sobre su centro activo no aparecen *Ser* ni grupos *sulfhidrido* (20). Su composición en aminoácidos muestra enormes semejanzas con las de otras reninas.

Su actividad óptima la desarrolla a pH bajos (5,5-7,5) y es marcadamente más estable a pH entre 4,0 y 6,0.

Para la determinación de la actividad hidrolítica de las reninas se utiliza el hexapéptido *Leu-Ser-Phe(NO<sub>2</sub>)-Nle-Ala-Leu-Ome* que reproduce la secuencia de la caseína  $\kappa$  sobre la cual actúan específicamente estas proteasas (21). De este modo se evitan los métodos indirectos de detección de la coagulación que utilizan como sustratos: leche, leche semidesnatada, soluciones de caseína, etc..

La actividad enzimática óptima frente al hexapéptido sintético la ejerce a 63°C y pH 4,7, obteniéndose unos valores para sus parámetros cinéticos de  $K_m$  0,129 mM y  $K_{cat}$  5,2 s<sup>-1</sup> (22).

\* \* \*

## METODOS

### 1. ACTIVACION DE LOS SOPORTES

#### 1.1. DISTINTAS ACTIVACIONES DEL SOPORTE DE AGAROSA

##### 1.1.1. PREPARACION DEL SOPORTE GLIOXIL-AGAROSA

El proceso de activación consiste en la esterificación de los grupos *hidroxilo* de la agarosa comercial con *glicidol* (2,3-epoxipropanol) y la posterior oxidación de los grupos *glicol* resultantes para dar lugar a grupos *glioxilo* reactivos (7). La etapa de oxidación es la que permite el control estequiométrico del proceso de activación para obtener los geles de agarosa con la densidad de grupos reactivos deseada.

Se procede del siguiente modo: A 150 ml de soporte agarosa (comercial) empaquetado y suspendido en 30 ml de agua se le añaden 50 ml de  $\text{NaOH}$  1,7 M con 28,5 mg/ml de  $\text{NaBH}_4$ . A continuación se agrega, lentamente y con agitación suave, *glicidol* hasta una concentración final de 2 M, controlando que la temperatura de la mezcla se mantenga entre 20 y 25°C. Transcurridas 18 horas con agitación constante, se filtra y lava el gel con agua abundante. En una segunda etapa se suspende el soporte obtenido anteriormente en 1,5 l de agua y se le agrega la cantidad apropiada de una solución de  $\text{NaIO}_4$  0,1 M para oxidar estequiométricamente sus grupos *glicol* y obtener la densidad de grupos *glioxilo* deseada. El consumo del agente oxidante tiene lugar en 90 minutos, transcurridos los cuales se lava con agua y se filtra el *gel glioxil-agarosa* resultante.

##### 1.1.2. PREPARACION DEL SOPORTE MANA-AGAROSA

Para la preparación de los soportes MANA-agarosa (*monoaminoetil-N-aminoetil-agarosa*) se parte de los soportes *glioxil-agarosa* (Apartado 1.1.1) con el grado de activación deseado. El proceso de activación es el mismo con independencia de la densidad de grupos activos del gel de partida.

Se procede del siguiente modo: Se suspenden 50 ml de *soporte glioxil-agarosa* en una solución de *etilendiamina* 2 M de pH 10,0, en relación final 1:5 ( $\text{Vol}_{\text{soporte}}:\text{Vol}_{\text{total}}$ ), manteniendo la mezcla con agitación suave a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se agregan 2 g de  $\text{NaBH}_4$  continuando la agitación 2 horas más y se procede al lavado del gel, en primer lugar con tampón borato 0,1 M, NaCl 1 M de pH 9,0, a continuación con tampón acetato 0,1 M, NaCl 1 M de pH 4,0 y, por último, con agua, para obtener finalmente el *gel MANA-agarosa* con la misma densidad de grupos reactivos del gel glioxil-agarosa de partida (23).

### 1.1.3. PREPARACION DEL SOPORTE GLUTARALDEHIDO-AGAROSA

Para la preparación de este soporte: Se suspende el gel MANA-agarosa en tampón fosfato 0,2 M de pH 7,0 en relación 1:1,8 (v:v) y, agitando suavemente, se le añade *glutaraldehído* 25% hasta una relación final 1:3 (v:v). Comprobando el mantenimiento del pH y de la temperatura entre 18 y 20°C, se dejan transcurrir 12-14 horas para filtrar y lavar con agua abundante y obtener el *gel glutaraldehido-agarosa* (24).

### 1.1.4. PREPARACION DE SOPORTES BDE-AGAROSA

Se ha diseñado un proceso de activación del soporte de gel de agarosa con *1,4-butanodiol-diglicidil-éter* (BDE) basado en el seguido utilizando glicidol como diepóxido activador. El proceso es el siguiente:

**1º Oxidación directa del soporte agarosa 6B-CL comercial:** Se suspende un volumen de gel agarosa en agua en relación 1:10 (v:v) y se trata con  $\text{NaIO}_4$  0,1 M hasta la oxidación total (18-20  $\mu\text{moles}$  /ml gel). Alcanzado el consumo máximo de oxidante, se filtra y se lava el soporte con agua abundante.

**2º Reducción total:** Se suspende el gel obtenido del paso anterior en tampón bicarbonato 50 mM de pH 10,0, relación 1:10 (v:v) y se trata con  $\text{NaBH}_4$  hasta concentración 1 mg/ml suspensión. Transcurridos 30 minutos de agitación suave, se filtra y se lava el soporte con tampón fosfato de pH 7,0 y con agua abundante.

**3º Activación con BDE:** Se han preparado dos soportes diferenciados en el grado de activación, para ello se han realizado tratamientos utilizando dos concentraciones de

reactivo en el medio de reacción: A cada 10 ml de soporte obtenido en el paso anterior se le añaden, en primer lugar 2 ó 11,42 ml de agua, a continuación 6,67 ml de solución de  $\text{NaOH}$  1,48 M con  $\text{NaBH}_4$  41,49 mg/ml y por último y lentamente 10,45 ó 1,05 ml de *BDE*. El resultado es una suspensión en la que el agente activante se encuentre en concentración 2 ó 0,2 M, según el grado de activación deseado. Después de 18 horas de agitación suave a temperatura ambiente se filtra y se lava el soporte con agua.

4º *Oxidación máxima de cada soporte*: Se suspende cada uno de los soportes obtenidos en el paso anterior en relación 1:10 (v:v) y se trata con  $\text{NaIO}_4$  0,1 M hasta la oxidación total (90 ó 18  $\mu\text{moles/ml}$  gel, respectivamente). Alcanzado el consumo máximo de oxidante, se filtra y se lava el soporte con agua abundante para obtener el correspondiente *gel BDE-agarosa*.

#### 1.1.5. PREPARACION DE SOPORTES DEXTRANO-AGAROSA

Se han diseñado y sintetizado dos tipos de soportes de agarosa 6B-CL activados con dextrano, a los cuales se les ha denominado:

- gel dextrano(oxidación total)-MANA-agarosa-75 o gel dextrano-agarosa-I.
- gel dextrano(oxidación parcial)-MANA-agarosa-20 o gel dextrano-agarosa-II.

##### ► Preparación del soporte dextrano-agarosa-I

1º Se prepara gel MANA-agarosa 6B-CL de máxima activación (75  $\mu\text{moles}$  de grupos amino por ml de gel) según el método descrito en el *Apartado 1.1.2*.

2º Se prepara una disolución de *dextrano-10.000* 3,33 mM en agua y se trata con 7,5 g de  $\text{NaIO}_4$  manteniendo la incubación a temperatura ambiente hasta el consumo total del oxidante, logrado lo cual se dializa frente a agua. De este modo se logra la oxidación total del dextrano, resultando una molécula polialdehídica de cadena larga.

3º Se disuelve *TMAB* en concentración 150 mM en tampón fosfato 100 mM de pH 7,0 y se le añade un volumen idéntico de la solución de dextrano oxidado. A la solución resultante se le incorpora el *gel MANA-agarosa* hasta una suspensión final 1:10 (v:v). Se ha comprobado que después de 2 horas de agitación suave a temperatura

ambiente se alcanza el máximo de unión del dextrano oxidado al soporte, por lo que se procede a la reducción de los enlaces formados que no se hayan reducido durante la incubación con TMAB: para ello se diluye a la mitad la suspensión con tampón bicarbonato 0,4 M de pH 10,0 y se agregan 5 mg de  $\text{NaBH}_4$  por ml de suspensión final. Transcurrida media hora de incubación se procede al filtrado y lavado con tampón fosfato de pH 7,0 y luego con agua.

4º Para activar las moléculas polifuncionales (*polihidroxilos*) unidas al soporte, se procede al tratamiento con *glicidol* del soporte obtenido en la etapa anterior siguiendo el mismo método que al activar la agarosa comercial (*Apartado 1.1.1*).

5º Para finalizar, una suspensión 1:10 (v:v) del gel obtenido en el paso anterior se trata con  $\text{NaIO}_4$  0,1 M dependiendo del grado de activación final con grupos glioxilo que se desee sobre el soporte (hasta un máximo de 450  $\mu\text{moles/ml}$  gel)

#### ► Preparación del soporte dextrano-agarosa-II

1º Se prepara *gel MANA-agarosa 6B-CL* con la máxima activación permitida, por oxidación directa (sin activación previa con *glicidol* de la agarosa comercial) y posterior tratamiento con EDA: el resultado es un soporte con 18-20  $\mu\text{moles}$  de grupos reactivos por ml gel.

2º Se preparan disoluciones de *dextrano-10.000* 3,33 mM en agua y se tratan con 6,75, 6,0 y 3,75 g de  $\text{NaIO}_4$ , manteniendo la incubación a temperatura ambiente hasta el consumo total del oxidante, logrado lo cual se dializa cada una frente a agua. De este modo se logran oxidaciones del dextrano al 90, 75 y 50%, respectivamente.

3º Se disuelve *TMAB* en concentración 150 mM en tampón fosfato 100 mM de pH 7,0 y se le añade un volumen idéntico de la solución de dextrano oxidado. A la solución resultante se le incorpora el *gel MANA-agarosa-20* hasta una suspensión final 1:10 (v:v). comprobado que después de 2 horas de agitación suave cesa la desaparición de dextrano de la solución por lo que se considera alcanzada la máxima carga de dextrano sobre el soporte, por lo que se procede a la reducción de los enlaces formados que no se hayan reducido durante la incubación con TMAB: para ello se diluye a la mitad la suspensión con bicarbonato 0,4 M de pH 10,0 y se agregan 5 mg de  $\text{NaBH}_4$  por ml de suspensión final. Transcurrida media hora de incubación se procede al filtrado y

lavado con tampón fosfato de pH 7,0 y luego con agua.

4º Para finalizar, una suspensión 1:10 (v:v) del gel obtenido en el paso anterior se trata con  $NaIO_4$  0,1 M dependiendo del grado de activación final con grupos glioxilo que se desee sobre el soporte (hasta un máximo de 200  $\mu$ moles/ml gel)

## 1.2. ACTIVACION DE SOPORTES TIPO RESINA

### 1.2.1. ACTIVACION DEL SOPORTE RESINA TOYOPEARL. PREPARACION DE SOPORTE GLIOXIL-TOYOPEARL

El proceso de activación es idéntico al seguido para el gel de agarosa (*Apartado 1.1*), siendo su densidad la misma. La activación máxima permitida es 100  $\mu$ moles de grupos glioxilo por ml de soporte húmedo bien filtrado.

### 1.2.2. ACTIVACION DEL SOPORTE RESINA EUPERGIT Y RESINA BIOSYNTH

Ambos soportes poseen grupos *epóxido* reactivos por ello se sigue el mismo proceso de activación en ambos casos.

El soporte comercial se encuentra seco por ello es necesaria primeramente su hidratación e hinchamiento. Se pesa una cantidad de soporte seco, se pone en una probeta y se le añade agua, agitando cada cierto tiempo para favorecer que el soporte se humedezca totalmente y, de este modo, se hinche. El gel húmedo se podrá almacenar en nevera, una vez lavado con agua y filtrado con una placa porosa. Las correspondientes densidades de los soportes hinchados y filtrados son: 0,8 g/ml para *Eupergit* y 0,77 g/ml para *Biosynth*.

#### ► Preparación de glioxil-resinas

Se prepara una suspensión 1:10 (v:v) de soporte húmedo bien filtrado en agua y se agrega ácido sulfúrico hasta pH 2,0. A las 14 horas de incubación a 40°C se filtra el soporte, lavándolo con abundante agua. A continuación se resuspende el soporte en agua



1:10 y se le agrega  $\text{NaIO}_4$  0,1 M según la densidad de grupos aldehído que se desee obtener hasta un máximo de 190  $\mu\text{moles/ml}$  gel para *Eupergit* y 130 para *Biosynth*. El consumo del agente oxidante tiene lugar en 90 minutos, transcurridos los cuales se lava la glioxil-resina resultante con abundante agua y se filtra.

#### ► Preparación de MANA-resinas

El proceso es idéntico que el seguido sobre el gel glioxil-agarosa (*Apartado 1.1.2*).

## 2. ENSAYOS PARA LA DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

### 2.1. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA RENINA

#### 2.1.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD HIDROLITICA

Se ensaya la actividad de esta proteasa usando el hexapéptido *Leu-Ser-Phe(NO<sub>2</sub>)-Nle-Ala-Leu-OMe*, propuesto por Raymond *et al.* (20), como sustrato de referencia, por la semejanza de su secuencia con la zona de la caseína  $\kappa$  sobre la que actúa específicamente esta enzima. La hidrólisis del enlace *Phe(NO<sub>2</sub>)-Nle* permite el seguimiento espectrofotométrico de la actividad enzimática gracias a la naturaleza cromofórica del aminoácido terminal *Phe(NO<sub>2</sub>)* presente en uno de los tripéptidos liberados. Las condiciones óptimas del ensayo, determinadas en estudios posteriores por Martin *et al.* (25), son: pH 4,7 y 310 nm ( $\epsilon=1000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

El ensayo utilizado ha sido el siguiente: A 2 ml de solución de sustrato 0,14-0,16 mM en tampón acetato 0,1 M de pH 4,7, termostatizadas a 25°C y con agitación constante, se les añaden 25-200  $\mu\text{l}$  de solución de enzima o de suspensión de derivado enzimático. El registro del incremento de absorbancia a 310 nm y 25°C en función del tiempo ( $\Delta\text{Abs}.\text{m}^{-1}$ ) permite determinar la velocidad inicial de hidrólisis en *Unidades de Actividad Hidrolítica* (una Unidad es la cantidad de enzima que es capaz de hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de hexapéptido por minuto en las condiciones indicadas).

### 2.1.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD COAGULANTE

Se ha utilizado un ensayo original para la determinación de la actividad coagulante de la enzima en solución o inmovilizada. Su importancia reside en la posibilidad del seguimiento espectrofotométrico del proceso, así como la posibilidad de relacionar Actividad Hidrolítica y Actividad Coagulante de la enzima.

El método se basa en el aumento de turbidez, registrado a 550 nm, que se produce al actuar la enzima sobre una solución de caseína  $\kappa$  (26). Los cursos totales de coagulación de caseína  $\kappa$ , catalizados por esta enzima, son de tipo sigmoideo, con un tiempo de latencia después del cual se desencadena el proceso de agregación registrado por el aumento de absorbancia con luz visible.

Las condiciones experimentales del ensayo son: A 2 ml de solución de caseína  $\kappa$  1 mg/ml en tampon citrato 50 mM, NaCl 75 mM de pH 5,3, termostatizada a 25°C y con agitación suave y constante, se le añaden 25-200  $\mu$ l de solución enzimática o de suspensión de derivado, registrando el incremento de absorbancia por minuto ( $\Delta$ Abs.min<sup>-1</sup>), producido a 550 nm como consecuencia de la reacción.

Se ha definido como *Tiempo de Coagulación* (s) al período transcurrido desde que la enzima se agrega a la solución de sustrato hasta el instante en el que el curso de coagulación registrado alcanza su punto de inflexión. Se ha propuesto como *Actividad Coagulante* (s<sup>-1</sup>) de la enzima a la inversa del *Tiempo de Coagulación*, siendo una *Unidad de Coagulación* la cantidad de enzima que coagula en 1 segundo 2 ml de disolución de caseína  $\kappa$  1 mg/ml en las condiciones experimentales estandarizadas.

### 2.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE TRIPSINA

Se ha seguido el ensayo publicado por Schwert y Takenaka (27). Se añaden 25-150  $\mu$ l de solución enzimática o de suspensión de derivado a 2 ml de solución de BAEE (*N* $\alpha$ -benzoil-L-arginina-etil-éster) 0,5 M en tampón borato 0,1 M de pH 7,6 a 25°C y con agitación suave, siguiendo el aumento de absorbancia que acompaña a la hidrólisis de sustrato sintético a 253 nm ( $\epsilon$ =750 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>). Una *Unidad de actividad* es la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de BAEE por minuto en las condiciones experimentales indicadas.

### 3. SEMIPURIFICACION DE LA SOLUCION DE RENINA DE *Mucor miehei* COMERCIAL

La semipurificación de una solución de extracto comercial de renina de *Mucor miehei* se realiza por adsorción iónica sobre gel *MANA-agarosa-75* y posterior desorción, después de abundantes lavados para eliminar del medio todo aquello que no se haya unido al soporte, por aumento de la fuerza iónica de la suspensión. Con este proceso se pretende, sobretodo, la eliminación de los azúcares que pudiera haber en el extracto comercial, para evitar posibles interferencias cuando se trate de oxidar la fracción glicosídica de la enzima.

El método es el siguiente: A una disolución de extracto enzimático comercial de 8 mg/ml en tampón fosfato 50 mM de pH 5,0 (1,44-1,6 U.H./ml) se le añade gel *MANA-agarosa-75* en relación 1:10 (v:v). Con agitación suave y a temperatura ambiente (18-20°C) se sigue el proceso de adsorción a través de la medida de actividad del sobrenadante hasta que la unión al soporte sea del 80-100%. Una vez lavado con cantidad abundante del mismo tampón y filtrado, se resuspende el gel en relación 1:10 en tampon fosfato 50 mM, NaCl 0,75 M de pH 7,0 y se agita suavemente durante 1 hora, tiempo aproximado que tarda en liberarse al sobrenadante el 95% de la renina que se había adsorbido. La disolución enzimática semipurificada obtenida posee 1,09-1,22 U.H./ml.

### 4. OXIDACION DE LAS CADENAS GLICOSIDICAS DE RENINA DE *Mucor miehei*

La modificación química de la glicoproteína se realiza sobre la solución enzimática semipurificada obtenida según el *Apartado 3*. Una vez comprobado que el pH se mantiene en 7,0, se tratan porciones de esta solución (que tendrá el 85% de la renina correspondiente a 8 mg de extracto comercial en cada ml) con  $\text{NaIO}_4$  0,1 M hasta una concentración final de 3,5  $\mu\text{moles}$  por U.H. (consumo máximo de oxidante por cada unidad de actividad hidrolítica). Cuando se desean oxidaciones parciales el volumen de solución de  $\text{NaIO}_4$  añadido se reduce hasta corresponder con 2,3 (para oxidación al 65%), 1,05 (para oxidación al 30%) y 0,52  $\mu\text{moles}$  de oxidante por U.H. de la solución (para oxidación al 15%).

## 6. PREPARACION DE DERIVADOS ENZIMATICOS POR INMOVILIZACION

### 6.1. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA de *Mucor miehei*

Se han preparado gran cantidad de derivados de renina de *Mucor miehei* con cada soporte, estudiándose la influencia de todas las variables que podrían afectar a cada ruta de inmovilización:

- grado de activación del soporte
- cantidad de enzima ofrecida
- temperatura de inmovilización
- duración de la incubación
- pH de la reacción

hasta optimizar el proceso de inmovilización sobre cada tipo de soporte. En cada caso la variación de una determinada condición queda bien explícita en la exposición de los resultados, por lo que para evitar la complicación de la descripción de los métodos se tratará la estrategia general de inmovilización.

El seguimiento del proceso de inmovilización, salvo que se indique lo contrario, se realiza controlando la actividad enzimática frente al sustrato sintético (hexapéptido). Una vez finalizada la inmovilización, filtrado y lavado el derivado y resuspendido en las condiciones óptimas se ensaya su actividad frente al sustrato macromolecular (caseína  $\kappa$ ).

#### 6.1.1. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA SOBRE GLIOXIL-SOPORTES (AGAROSA, TOYOPEARL, EUPERGIT Y BIOSYNTH)

Se prepara una solución de extracto enzimático en tampón bicarbonato 0,1 M de pH 10,0, y, separándose una pequeña fracción como control del comportamiento de la enzima en solución, se añade el glioxil-soporte de grado de activación elegido en relación 1:10. Comprobando que el pH no se ha modificado y manteniendo homogénea la suspensión y constante la temperatura, se sigue el proceso de insolubilización comparando actividades enzimáticas de sobrenadante, suspensión y solución enzimática

control. Cuando se considera alcanzado el rendimiento deseado de inmovilización, se agrega  $\text{NaBH}_4$  en una concentración final de 1 mg/ml de suspensión (10, 27); transcurrida media hora a temperatura ambiente, o 1 hora si el tratamiento ha tenido lugar a 4°C, se procede al lavado con abundante tampón fosfato de pH 7,0 y posteriormente con agua.

### 6.1.2. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA SOBRE MANA-SOPORTES

El gel activado con grupos amino primarios accesibles permite la inmovilización de enzimas a través ya de los grupos carboxilo de su estructura polipeptídica, ya de las cadenas glicosídicas previamente oxidadas cuando se trata de glicoenzimas, como es el caso de la renina de *Mucor miehei*.

#### ► Inmovilización de renina a través de su fracción proteica a MANA-soportes

El método seguido ha sido el siguiente: Se prepara una solución del extracto enzimático comercial en tampón acetato 50 mM de pH 5,0 y, separándose una pequeña fracción como control del comportamiento de la enzima en solución, se añade el *gel MANA-agarosa* de grado de activación elegido en relación 1:10. Comprobando que el pH no se ha modificado y manteniendo homogénea la suspensión y constante la temperatura, se sigue el proceso de insolubilización comparando actividades enzimáticas de sobrenadante, suspensión y solución enzimática control. Cuando se considera alcanzado el rendimiento deseado de la adsorción, se agrega directamente al medio de reacción *CDI* en la concentración final elegida (1, 3 ó 10 mM). Controlando el mantenimiento de pH y temperatura y con agitación suave se incuba durante 1,5 horas. Transcurrido este tiempo se procede al lavado con abundante tampón acetato de pH 5,0 y posteriormente con agua.

Para favorecer la desorción de todo aquello que no se haya unido covalentemente al soporte y poder determinar el rendimiento real de la inmovilización covalente, se resuspende el derivado enzimático resultante en tampón acetato 50 mM, NaCl 0,75 mM de pH 7,0, y se ensaya la aparición de actividad hidrolítica en el sobrenadante. Una vez finalizada la desorción, se lava el derivado con abundante cantidad de una solución tampón idéntica a la utilizada en esta tercera etapa y después con el mismo tampón sin NaCl.

**► Inmovilización de renina a través de su fracción glicosídica a MANA-soportes**

Basándose en estrategias de modificación química de las cadenas de azúcares de glicoproteínas para su activación y posterior inmovilización, se han desarrollado en nuestro laboratorio diferentes métodos de inmovilización a través de estas cadenas poliglicosídicas, una de ellas es la utilizada con la renina de *Mucor miehei* que se tratará en el presente trabajo.

El método seguido ha sido el siguiente: Se prepara una solución semipurificada de extracto enzimático (*Apartado 3*) y oxidada en el grado deseado (*Apartado 4*), se enfría hasta 4°C y se diluye 1:1,5 con tampón bicarbonato 0,2 M de pH 10,0 a la misma temperatura, comprobándose el mantenimiento del pH a 10,0. Separando una pequeña fracción como control del comportamiento de la enzima en solución, se añade el *MANA-soporte* de grado de activación elegido en relación 1:10. Comprobando que el pH no se ha modificado y manteniendo homogénea la suspensión y constante la temperatura, se sigue el proceso de insolubilización comparando actividades enzimáticas de sobrenadante, suspensión y solución enzimática control. Cuando se considera alcanzado el rendimiento deseado de inmovilización, se agrega  $\text{NaBH}_4$  en una concentración final de 1 mg/ml de suspensión; transcurrida media hora a temperatura ambiente, o 1 hora si el tratamiento ha tenido lugar a 4°C, se procede al lavado con abundante tampón fosfato de pH 7,0 y posteriormente con agua.

**6.1.3. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA SOBRE GEL GLUTARALDEHIDO-AGAROSA**

El método seguido ha sido el siguiente: Se prepara una solución de extracto enzimático comercial en tampón adecuado 0,1 M de pH 5,5-8,5. Separándose una pequeña fracción como control del comportamiento de la enzima en solución, se añade el *gel glutaraldehído-agarosa* de grado de activación elegido y en relación 1:10. Comprobando que el pH no se ha modificado y manteniendo homogénea la suspensión y constante la temperatura elegida, se sigue el proceso de insolubilización comparando actividades enzimáticas de sobrenadante, suspensión y solución enzimática control. Cuando se considera alcanzado el rendimiento deseado de inmovilización, se agrega  $\text{NaBH}_4$  en una concentración final de 1 mg/ml de suspensión; transcurrida media hora a temperatura ambiente o 1 hora si el tratamiento ha tenido lugar a 4°C, se procede al

lavado con abundante tampón fosfato de pH 7,0 y posteriormente con agua.

#### 6.1.4. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA SOBRE GEL BDE-AGAROSA

Se prepara una solución de extracto enzimático en tampón bicarbonato 0,1 M de pH 10,0, y, separándose una pequeña fracción como control del comportamiento de la enzima en solución, se añade el gel *BDE-agarosa* con grado de activación elegido (18 ó 90  $\mu$ moles de grupos reactivos/ml gel) en relación 1:10. Comprobando que el pH no se ha modificado y manteniendo homogénea la suspensión y constante la temperatura, se sigue el proceso de insolubilización comparando actividades enzimáticas de sobrenadante, suspensión y solución enzimática control. Cuando se considera alcanzado el rendimiento deseado de inmovilización, se agrega  $\text{NaBH}_4$  en una concentración final de 1 mg/ml de suspensión; transcurrida media hora a temperatura ambiente, o 1 hora si el tratamiento ha tenido lugar a 4°C, se procede al lavado con abundante tampón fosfato de pH 7,0 y posteriormente con agua.

#### 6.1.5. PREPARACION DE DERIVADOS DE RENINA SOBRE GELES DEXTRANO-AGAROSA

Se ha preparado dos tipos de derivados de renina de *Mucor miehei* por haberse utilizado dos soportes que se diferencian en el método de activación de agarosa con dextrano (*Apartado 1.1.5*). El proceso de inmovilización es idéntico al seguido para los derivados enzimáticos sobre soportes activados con grupos glioxilo (*Apartado 6.1.1*).

#### 6.2. PREPARACION DE DERIVADOS DE TRIPSINA SOBRE GLIOXIL-SOPORTES (AGAROSA, TOYOPEARL, EUPERGIT Y BIOSYNTH)

Sobre cada uno de los soportes (agarosa 6B-CL, agarosa 10B-CL, *Toyopearl*, *Eupergit* y *Biosynth*) se preparan dos tipos de derivados: unos en los cuales la inmovilización tendrá lugar en condiciones suaves (en presencia de *benzamidina* como inhibidor) para evitar al máximo pérdidas de actividad enzimáticas y teniendo como objetivo la carga enzimática máxima que permita el soporte; y otros derivados que, una vez inmovilizada la cantidad de enzima deseada, se incubarán en condiciones que

favorezcan la multiinteracción de cada molécula con el soporte, independientemente de lo que ocurra con la actividad de la enzima inmovilizada. La finalidad de los primeros es el estudio de la máxima capacidad de carga para la determinación de las densidades específicas de grupos reactivos de soportes con diferente morfología interna (*Resultados*, 3.2.1). Los segundos han permitido la determinación del grado de congruencia geométrica con la enzima permitido por cada soporte en términos relativos.

El método seguido ha sido el siguiente: Se disuelve *tripsina* comercial en una solución de *benzamidina* 2 mM en tampón borato 0,1 M de pH 10,0, se separa una pequeña fracción como control del comportamiento de la enzima en solución, se añade el *glioxil-soporte* de grado de activación elegido en relación 1:10. Comprobando que el pH no se ha modificado y manteniendo homogénea la suspensión a temperatura ambiente, se sigue el proceso de insolubilización comparando actividades enzimáticas de sobrenadante, suspensión y solución enzimática control. Cuando se considera alcanzado el rendimiento deseado de inmovilización, se agrega  $\text{NaBH}_4$  en una concentración final de 1 mg/ml de suspensión; transcurrida media hora a temperatura ambiente, se procede al lavado con abundante tampón fosfato de pH 7,0 y posteriormente con agua.

Cuando se pretende aumentar el número e intensidad de las interacciones entre cada molécula de enzima inmovilizada y el soporte, se procede del siguiente modo: una vez que se ha logrado la máxima carga enzimática, se filtra el derivado y se lava lentamente con tampón borato 0,1 M de pH 10,0 abundante para asegurarse de la eliminación del inhibidor, se incuba en este mismo tampón en relación 1:10 y se sigue el transcurso del proceso de interacción enzima-soporte a través de la medida de la actividad enzimática remanente del derivado. Transcurrido el tiempo considerado necesario (en algunos casos varios días) se procede a la reducción con  $\text{NaBH}_4$  según se ha descrito para los derivados de renina.

\* \* \*



## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DE RENINA

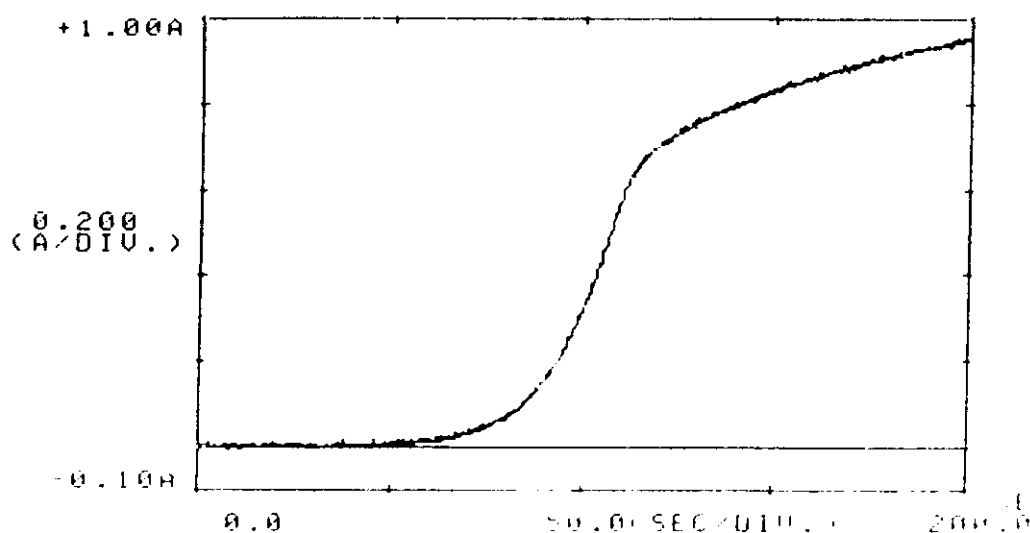
Como se ha tratado en la Introducción, la coagulación es un complejo proceso que no sólo esta determinada por la actividad hidrolítica de la enzima sino por una serie de factores interrelacionados que todavía no se conocen totalmente, que dan lugar a la formación de un precipitado proteico. Identificado el enlace de la caseína  $\kappa$  sobre el que actúan específicamente las enzimas caseinolíticas y conocida la posibilidad de separación de la reacción enzimática del posterior proceso de formación del coágulo, consecuencia del primero, se han sintetizado diferentes péptidos que incluyen el enlace *Phe-Met* de la caseína  $\kappa$  para el estudio de la relación estructura del substrato con la especificidad de la enzima (29) y para ser utilizados en la determinación de la actividad enzimática real de la enzima (actividad hidrolítica) y de los factores que afectan al proceso enzimático y no a los procesos posteriores en los que no participa el biocatalizador.

Así se propuso el hexapéptido *Hleu-Ser-Phe(NO<sub>2</sub>)-Nle-Ala-Leu-Ome* como substrato referencia para la determinación de la actividad proteolítica de renina (21, 30). Este péptido fácilmente hidrolizado por esta enzima contiene una sonda espectroscópica *Phe(NO<sub>2</sub>)* por lo que proporciona un método directo y reproducible para los estudios de actividad enzimática.

Sin embargo el substrato natural de la enzima, caseína, es un substrato de gran complejidad. Cuando la enzima sufre algún tipo de proceso que de lugar a modificación química o estructural, o a disminución de la disponibilidad física de su centro activo, etc. sus propiedades catalíticas pueden reflejar diferentes consecuencias dependiendo del substrato al que se refieran. Se puede preveer que el substrato voluminoso se verá más afectado por las modificaciones de la enzima que el substrato sintético el cual manifestará sólo aquellas que afecte al centro activo. Por ello hemos considerado imprescindible para el estudio de la inmovilización de esta enzima que actúa sobre una substrato macromolécula como la caseína  $\kappa$  el disponer de dos ensayos que premitan

relacionar la *Actividad Coagulante* de caseína  $\kappa$  (hidrólisis enzimática + agregación) con la correspondiente *Actividad Hidrolítica* frente al hexapéptido sintético. Para lo cual lo primero sería disponer de un ensayo de actividad coagulante objetivo y reproducible.

El diseño de un ensayo adecuado para la cuantificación de la actividad coagulante de estas proteasas que hidrolizan específicamente la caseína  $\kappa$  se ha basado en la observación de que la acción de estas enzimas sobre una disolución de dicha proteína láctea a 25°C provoca un aumento progresivo de la turbidez que culmina con la coagulación (26). El registro del incremento de absorbancia ( $\Delta Abs.min^{-1}$ ) a 550 nm, muestra un curso total de tipo sigmoideo: un período de latencia inicial durante el cual el valor de la absorbancia permanece constante, seguido por un repentino incremento exponencial del mismo que alcanza un punto de inflexión después del cual la velocidad del aumento de absorbancia disminuye hasta prácticamente anularse (Figura I.7).

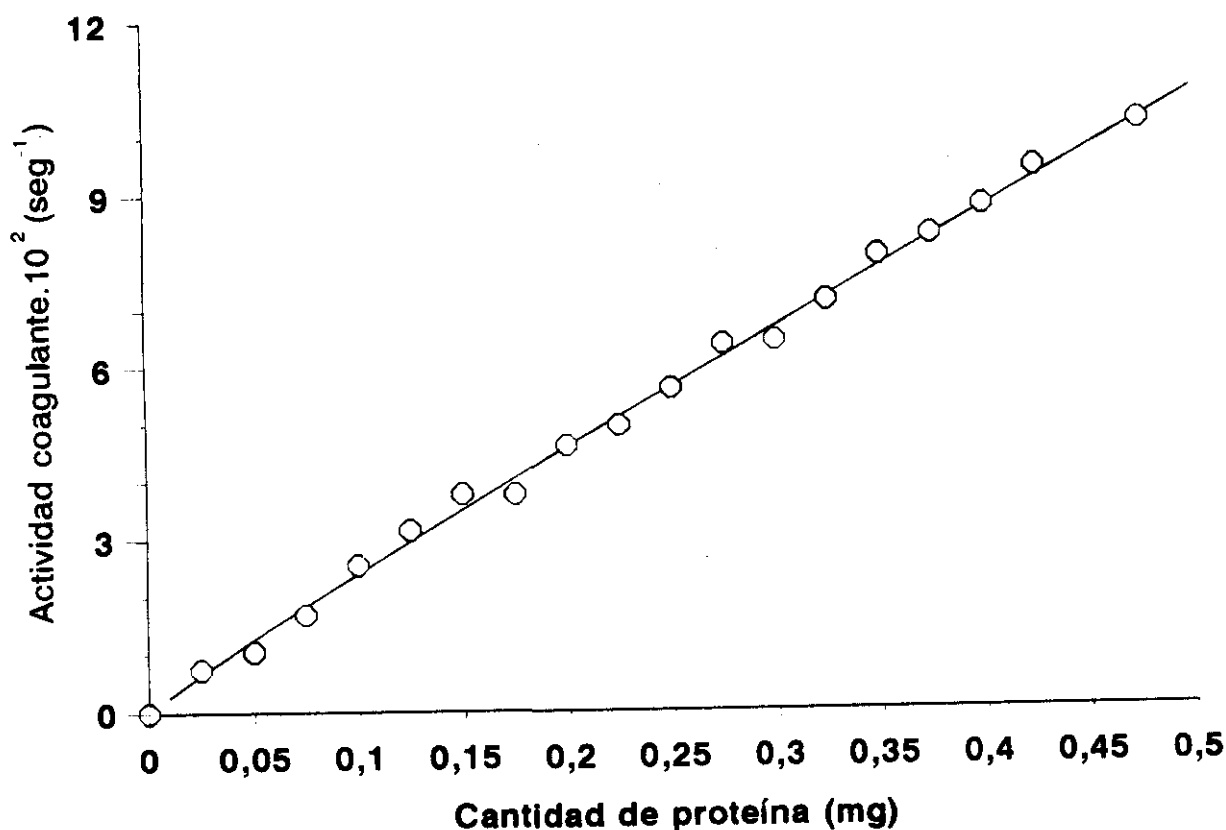


**Figura I.7.** Registro espectrofotométrico del incremento de absorbancia en función del tiempo a 550 nm experimentado por una disolución de caseína  $\kappa$  tratada con renina.

Este proceso se ajusta a un modelo en el que el período de latencia inicial corresponde a la etapa enzimática (hidrólisis específica de la molécula de caseína  $\kappa$  para dar para- $\kappa$ -caseína y un macropéptido). La fase posterior de incremento exponencial de la absorbancia es debida a la segunda etapa del proceso global: insolubilización, agregación y precipitación, que se desencadena al alcanzarse una determinada concentración crítica de para- $\kappa$ -caseína, por encima de la cual no es estable en solución.

Una vez que ha tenido lugar la coagulación propiamente dicha, la mezcla de reacción inicial se transforma en una suspensión del precipitado en la fracción soluble por lo que cesa el incremento de la absorbancia en el medio.

Se ha definido como *Tiempo de Coagulación (TC)* al período transcurrido desde que se añade la muestra de enzima a la mezcla de reacción hasta que el curso del proceso seguido a 550 nm alcanza su punto de inflexión. Representando gráficamente  $1/TC$  frente a la concentración de enzima en la cubeta de reacción se observa proporcionalidad, manteniendo constantes la temperatura del ensayo y la concentración de caseína  $\kappa$  (Figura I.8).



**Figura I.8.** Representación gráfica de la actividad coagulante frente a la cantidad de proteína del extracto enzimático de renina de *M. miehei*.

Ello indica que existirá para unas condiciones de reacción determinadas una concentración crítica de producto (para- $\kappa$ -caseína) por encima de la cual se desencadena el proceso de coagulación, y en consecuencia manteniendo condiciones de reacción

estandarizadas (pH, temperatura, agitación y concentración de sustrato) el tiempo necesario para alcanzar dicho grado de hidrólisis de caseína  $\kappa$  es inversamente proporcional a la concentración de enzima activo.

Se ha definido como *Actividad Coagulante* a la inversa del Tiempo de Coagulación:  $1/TC$ . Una *Unidad de Actividad Coagulante* es, por tanto, la cantidad de enzima que hace que 1 mg de caseína  $\kappa$  alcance el punto de máxima pendiente (punto de inflexión) en 1 segundo en las condiciones estandarizadas para el ensayo. Sus valores se expresarán en:  $s^{-1}$ .

\* \* \*

El disponer de ensayos sencillos, objetivos y reproducibles, para la medida de las actividades hidrolítica y coagulante, permite relacionar ambas, para cuantificar los efectos de procesos como modificaciones químicas o la inmovilización y que podrían afectar en diferente medida a la actividad enzimática en función del volumen de la molécula de sustrato sobre el que actúe.

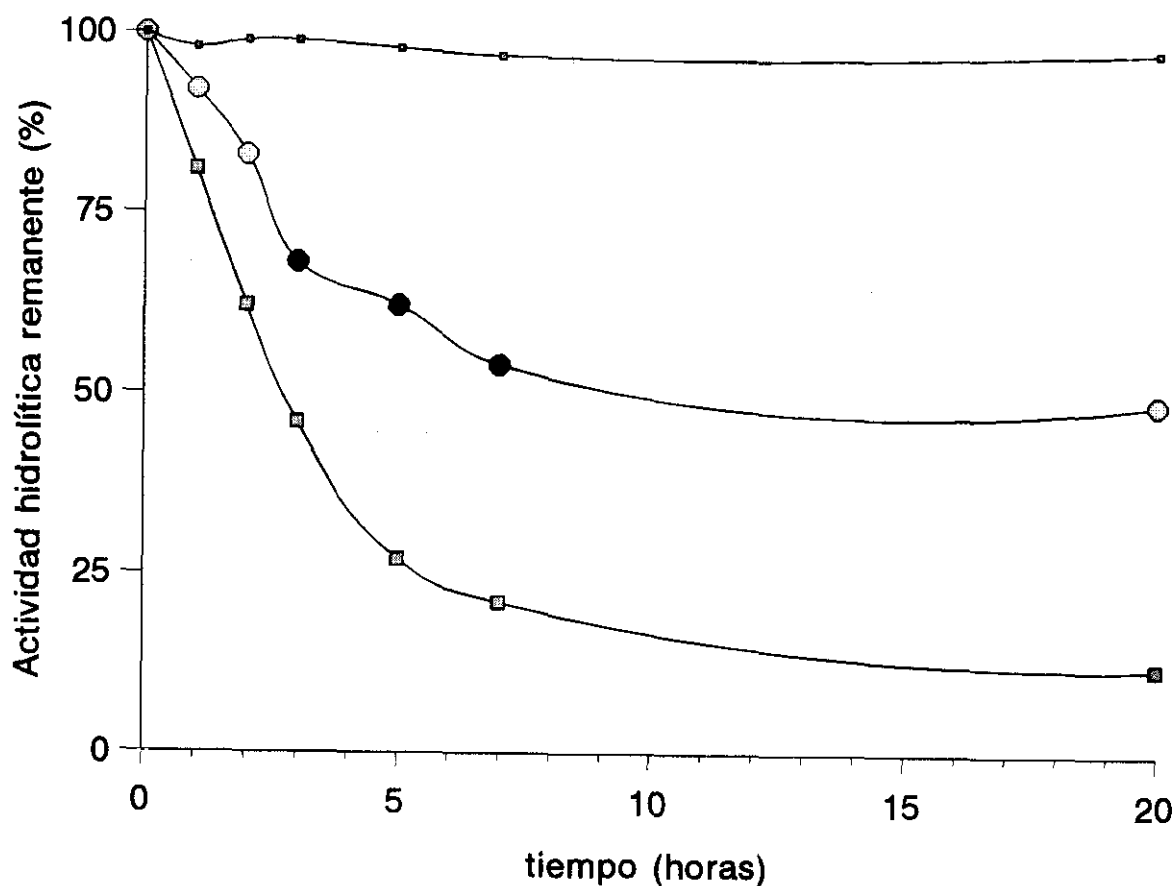
Se ha denominado *Actividad Coagulante Remanente (A.C.R.)* a la relación entre la Actividad Coagulante que conserva un derivado enzimático y la Actividad Coagulante teórica que le correspondería si se tratase de la enzima en su estado nativo, calculada por extrapolación en la curva patrón partir de la Actividad Hidrolítica que posee. Este valor de *A.C.R.* es el que se ha manejado a la hora de cuantificar la eficacia como coagulantes lácteos de los derivados enzimáticos preparados, expresado en porcentaje.

## 2. CARACTERIZACION DEL EXTRACTO COMERCIAL DE *Mucor miehei*

La aplicación de diferentes estrategias de inmovilización a una enzima requiere el conocimiento del comportamiento de la enzima en solución, así como del intervalo de condiciones experimentales en el que el manejo no afecte a sus propiedades catalíticas. Por ello se ha realizado un estudio inicial sobre el extracto enzimático para conocer su actividad catalítica y su estabilidad en las condiciones de preparación de derivados.

Se ha determinado un contenido proteico de este extracto del 26-30% y una actividad hidrolítica de 0,18-0,2 U.H. por mg de extracto, lo cual da un valor de actividad específica de 0,6-0,77 U.H. por mg de proteína.

Para conocer los márgenes de manejabilidad de la enzima y la posibilidad de aplicación de las diferentes estrategias de inmovilización propuestas se ha estudiado la estabilidad de diferentes soluciones enzimáticas en las condiciones óptimas para cada reacción de inmovilización. Por ello se han realizado incubaciones de la enzima a pH 5,0, 7,0 y 10,0 pues son los ideales para cada una de ellas.



**Figura I.9.** Cursos de inactivación térmica de renina de *Mucor miehei* en tampón acetato 50 mM de pH 5,0 a 65°C (□), en tampón fosfato 50 mM de pH 7,0 a 40°C (●) y en tampón bicarbonato 50 mM de pH 10,0 a 33°C (■).

La renina de *Mucor miehei* conserva el 100 % de su actividad enzimática durante 24 horas a 25°C en medio acuoso en el intervalo de pH entre 5,0 y 10,0. En este intervalo de pH es tanto más estable térmicamente cuanto más ácido es el medio, según se muestra en la figura I.9, la incubación a pH 5,0 conserva toda su actividad inicial

Se han obtenido derivados con la suficiente cantidad de enzima inmovilizada en los que la unión al soporte no ha afectado a la actividad enzimática de las moléculas (A.H.R.~100%). Para ello ha sido necesario disminuir la temperatura de incubación, acortar el tiempo de contacto o reducir la densidad de grupos reactivos sobre el soporte, pues ello supone la disminución de la reactividad de los grupos implicados en el proceso, como se refleja en los menores rendimientos de inmovilización que van de un 95% a tan solo el 5-7% de la enzima ofrecida al soporte. Por el contrario, cuando la inmovilización tiene lugar a 20°C sobre un soporte muy activado la interacción es tan intensa que, incluso siendo el tiempo de contacto corto, el derivado pierde actividad enzimática frente al hexapéptido (A.H.R.=75%). Puesto que la enzima en solución es estable en las condiciones de la reacción, se puede suponer que la inactivación será debida a la interacción con el soporte.

Esto quiere decir que al suavizar las condiciones de inmovilización la enzima sufre menos en la interacción, por permitirse una mejor adaptación al soporte de cada molécula que se insolubiliza, la reversibilidad de cada uno de los enlaces formados evita segundas interacciones que supongan distorsión de la enzima y, en consecuencia, favorece las que menos afecten a su estructura 3D. El resultado del proceso supone la unión covalente a un soporte de moléculas de enzima que conservan el 100% de su actividad enzimática (A.H.R.).

En cuanto a la actividad enzimática de los derivados preparados medida frente al sustrato natural (A.C.R.), la tabla muestra que la optimización del proceso de inmovilización hasta que no refleje pérdidas en la actividad hidrolítica remanente duplica la actividad coagulante remanente. Sin embargo suavizando al máximo las condiciones de preparación del derivado (mínimo grado de activación del soporte, interacción corta y a temperatura baja) la citada actividad no supera el 2,38% con respecto a la que debería mostrar la enzima en solución con su misma actividad hidrolítica. Cuando el derivado se prepara sin control del proceso de interacción su actividad coagulante remanente es menor del 0,5%.

Los resultados podrían estar confirmando lo que hasta ahora habían sido meras suposiciones racionales del impedimento estérico que debería suponer la inmovilización de una proteína para la interacción con su ligando cuando éste es una molécula voluminosa. En las condiciones de reacción más suaves, la reactividad es tan baja que pocos grupos de cada molécula estarían participando de la unión y por lo tanto la

inmovilización supondría la mínima modificación química de la enzima, que no afecta a la conformación activa pues su actividad hidrolítica se conserva. Sin embargo perjudica a la actividad catalítica sobre caseína, lo cual implica que de algún modo se ha visto afectada bien la accesibilidad de este sustrato al centro activo, bien alguna zona de reconocimiento diferente del centro activo que sólo participa en el proceso catalítico con el sustrato natural y que cuando la enzima está en solución se encuentra inalterada. El valor de A.C.R. que se utiliza se refiere a la actividad coagulante que mostraría la enzima en solución si mostrase la misma actividad hidrolítica que el derivado objeto de estudio.

Dada la importancia de la suavidad en las condiciones de inmovilización a la hora de lograr no sólo buenas actividades hidrolíticas (A.H.R.), sino también mejores actividades coagulantes, el abordaje de las siguientes estrategias de inmovilización se llevará a cabo buscando la mínima interferencia por parte del soporte.

### **3.1.2. INMOVILIZACION A TRAVES DE LOS GRUPOS CARBOXILO SUPERFICIALES (*Asp* y/o *Glu*) DE LA ENZIMA SOBRE SOPORTE MANA-AGAROSA**

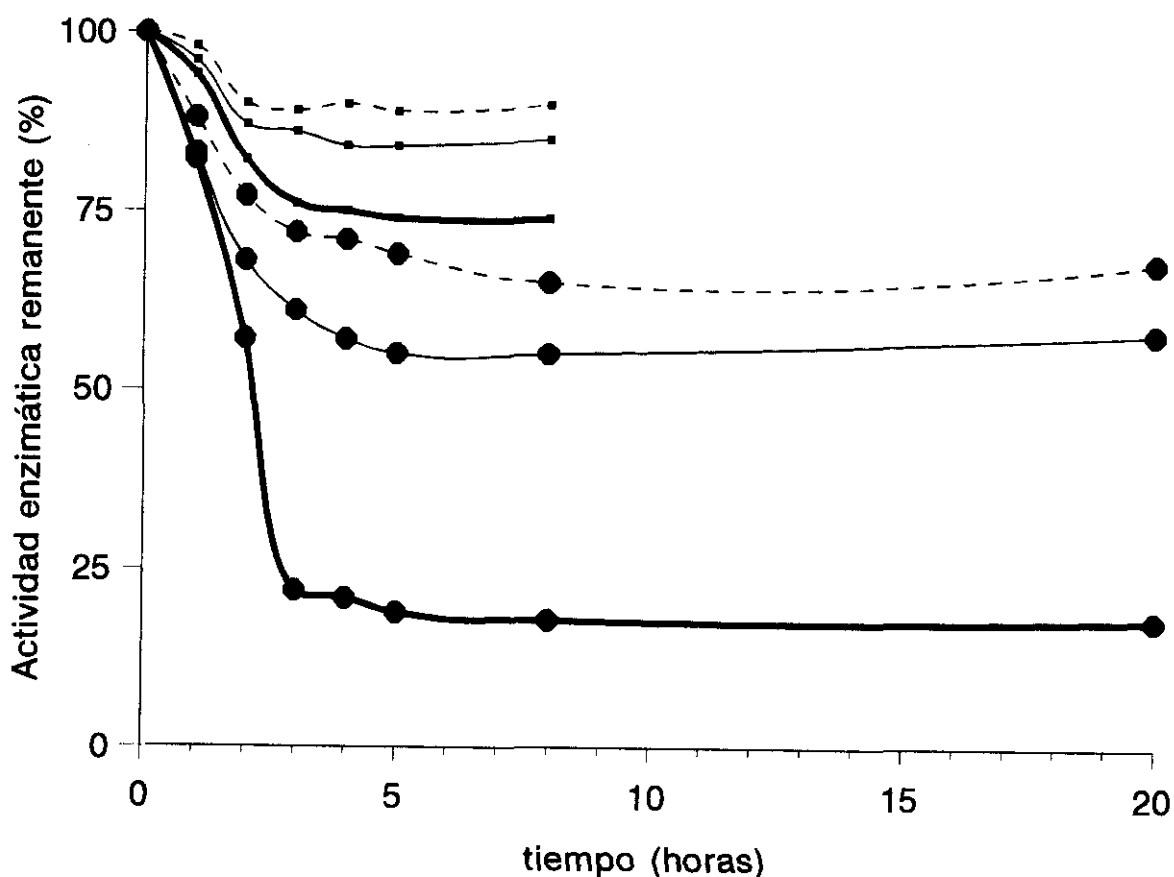
Para que un grupo *carboxilo* sufra el ataque nucleofílico de un grupo *amino* ( $pK \sim 10,2$ ), el primero ha de ser activado con CDI y el grupo amino deberá encontrarse en el medio adecuado para ser reactivo, sin embargo el pH óptimo del medio para cada uno de los dos procesos es muy diferente: pH ácido para la activación del carboxilo y pH básico que confiera al grupo amino la nucleofilia necesaria. Los soportes MANA-agarosa se encuentran activados con grupos amino primarios con un  $pK$  cercano a 6,8 debido a la presencia de un segundo grupo amino secundario muy próximo, esto hace posible que su reacción pueda tener lugar a pH más bajos a los cuales los grupos carboxilo sí podrán ser activados.

#### **► Efecto de la modificación química con carbodiimida (CDI) sobre la actividad y estabilidad de la enzima en solución**

Para la inmovilización de la enzima sobre soporte MANA-agarosa, será imprescindible la activación de los carboxilos con CDI a pH ligeramente ácido debido a la estabilidad y reactividad de este agente. Para evaluar la posibilidad de aplicación de

esta estrategia de inmovilización sobre la enzima en cuestión, es necesario un estudio previo del efecto que sobre la enzima en solución causaría la modificación química con CDI; este estudio también será útil para dar una idea del intervalo de concentraciones y/o temperatura que permiten buena manejabilidad de la enzima.

Habiéndose puesto de manifiesto la alta estabilidad de la enzima en medios ácidos (*Apartado 2*), se ha estudiado el efecto que sobre la enzima en solución tendrá la modificación química con CDI en las condiciones en las que tendrá lugar la reacción de inmovilización. En la figura I.10 se muestran los resultados de la incubación de una solución del extracto enzimático con tres concentraciones de CDI, a través de la representación de las actividades remanentes tanto hidrolítica como coagulante en función del tiempo de incubación transcurrido cuando el tratamiento tiene lugar a 4°C.



**Figura I.10.** Efecto de la modificación química con CDI sobre las actividades hidrolítica (■) y coagulante (●) de renina de *Mucor miehei*, siendo las concentraciones de CDI en el medio de  $1.10^{-3}$  M (...),  $3.10^{-3}$  M (—) y  $1.10^{-2}$  M (■). Condiciones de incubación: Solución enzimática en tampón acetato de pH 5.0 a 4°C.



De este estudio se obtienen tres importantes resultados:

- La pérdida de actividad ocasionada por la CDI es tanto más importante cuanto mayor es la concentración de agente en el medio.
- El efecto inactivante se manifiesta en las dos primeras horas de incubación.
- La modificación química afecta en mayor grado a la actividad enzimática medida frente al substrato macromolecular.

En relación con el último de los resultados se podría pensar en que la modificación química tiene un efecto muy diferente sobre el reconocimiento de cada uno de los substratos: caseína  $\kappa$  y hexapéptido sintético. Al ser la primera una molécula voluminosa, la unión a la enzima podría tener lugar con la participación adicional de alguna zona alejada del centro activo cuya modificación (p.e. por tratamiento con CDI) no afecta sin embargo al reconocimiento del substrato sintético.

► **Efecto de la fuerza iónica del medio sobre la actividad de la enzima en solución**

La preparación de derivados enzimáticos sobre *gel MANA-agarosa* supone la utilización de un soporte ionizable.

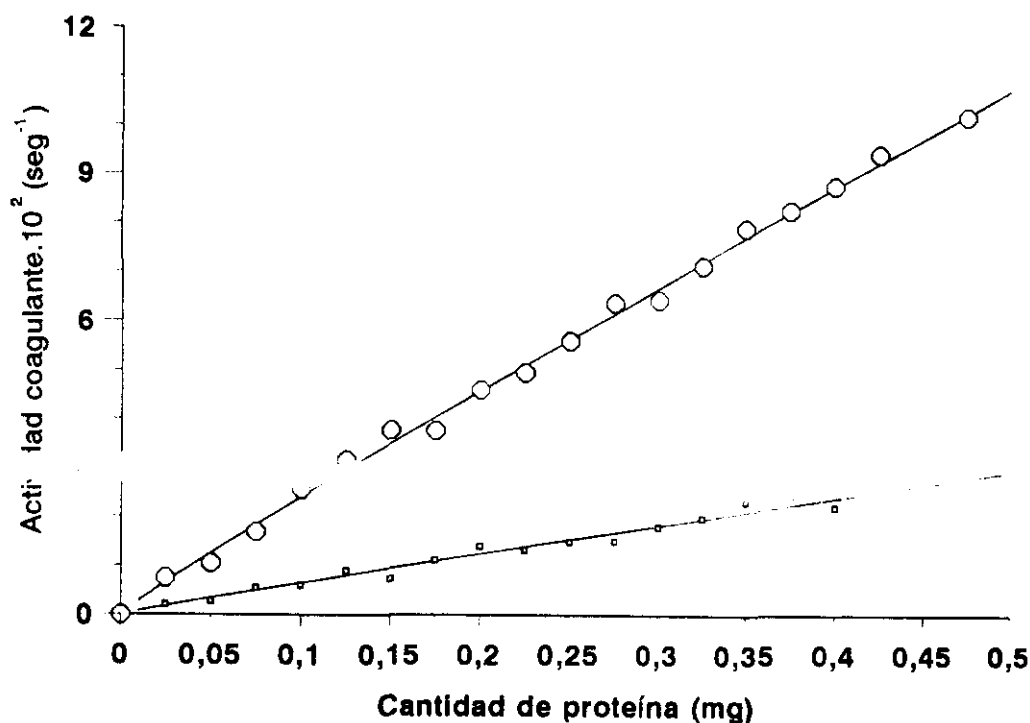
Cuando la inmovilización se realiza sobre el *soporte glioxil-agarosa*, la unión covalente de la enzima al soporte implica la desactivación de la superficie de dicho soporte por la reducción de los grupos *aldehído* reactivos dando lugar a grupos *hidroxilo* inertes; sin embargo al utilizar *soportes MANA-agarosa* los grupos *amino* del soporte que no han reaccionado con la enzima permanecen intactos sobre su superficie. Cuando estos derivados son incubados en las mezclas de reacción de cualquiera de los dos substratos en los que el pH es ácido, se producirán interacciones electrostáticas entre estos grupos del soporte y de los grupos *carboxilo* que no hayan reaccionado, las cuales podrían afectar a la conformación activa de la enzima.

Para eliminar dichas interacciones de naturaleza electrostática y poder analizar únicamente el efecto que, sobre la conformación activa de la molécula, tiene la inmovilización covalente, se ha de ensayar la actividad enzimática de los derivados obtenidos en medios con alta fuerza iónica. Por ello se ha creído conveniente el estudio

del efecto del incremento de la fuerza iónica sobre las actividades enzimáticas de la enzima en solución para poder relacionarlo posteriormente con el provocado sobre cada derivado enzimático.

Se ha estudiado cómo afecta la presencia de NaCl 0,5 M en ambos ensayos enzimáticos, mostrándose una total independencia de la actividad hidrolítica ante el aumento de la fuerza iónica del medio de reacción y una caída de la actividad coagulante al 29% frente a las condiciones de reacción estándar.

En condiciones estándar se ha comprobado la proporcionalidad de la actividad coagulante en función de la cantidad de enzima (Figura I.8). La representación de las actividades coagulantes medidas en un medio con alta fuerza iónica (NaCl 0,5M) en función de la cantidad de enzima vuelve a manifestar dicha proporcionalidad pero con una importante disminución de la pendiente de la curva debido precisamente a esta caída de actividad coagulante al 29% que supone la presencia de alta concentración de NaCl (Figura I.11).



**Figura I.11.** Representación gráfica de la actividad coagulante frente a la cantidad de proteína del extracto enzimático de renina de *M. miehei*, en un medio de reacción estándar (○) y en un medio de reacción con NaCl 0,5 M (◻).

Ya en la bibliografía se recoge este efecto de la fuerza iónica sobre la coagulación, el cual no afecta a la reacción enzimática de hidrólisis sino a los mecanismos que desencadenan la precipitación de la caseína. Probablemente los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  actúan estabilizando la fracción p- $\kappa$ -caseína evitando su insolubilización. es necesaria un mayor rendimiento de la etapa enzimática para que la fuerza iónica no sea capaz de estabilizar el producto y que la coagulación se desencadene (26).

\* \* \*

Se han estudiado todas la condiciones que afectan al proceso (31): temperatura y duración de la adsorción, concentración adecuada de CDI, densidad de grupos reactivos en el soporte y multiinteracción iónica, hasta obtener los derivados mostrados en la tabla I.2. Las condiciones de incubación seleccionadas han favorecido la interacción "suave". En todos ellos se comprobó el mantenimiento de toda la actividad de la enzima inmovilizada en lo que respecta a hidrólisis del sustrato sintético (A.H.R.).

DERIVADO	grado activación soporte (a)	Rend <sub>ADS</sub> (b)	Rend <sub>INM</sub> (b)	A.H.R. (c)	
				(d)	(e)
A	75	77	26	44	~100
B	30	37	12	70	~100
C	15	17	5	67	~100

*Condiciones experimentales: 55 mg extracto enzimático comercial ofrecidos por ml gel; 4°C(adsorción y tratamiento con CDI); 0,5 horas (adsorción) y CDI  $1.10^{-3}\text{M}$ .*

*(a)  $\mu\text{moles}$  de grupos amino primarios por ml de gel.*

*(b) Cantidad de enzima adsorbida/inmovilizada covalentemente con respecto a la cantidad de enzima ofrecida y activa en las condiciones del proceso.*

*(c) Actividad Hidrolítica Remanente: Actividad hidrolítica ensayada con respecto a la cantidad de enzima inmovilizada en cada derivado.*

*(d) Solución de sustrato estándar.*

*(e) Solución de sustrato con  $\text{NaCl}$  0,5M.*

**Tabla I.2.** Derivados enzimáticos de renina de *Mucor miehei* preparados por inmovilización sobre los soportes MANA-agarosa.

La adsorción de la enzima a los diferentes soportes ha tenido lugar a 4°C en 1 hora, obteniéndose los rendimientos expresados en la tabla. Se comprobó que prolongación de la incubación no aumenta los rendimientos. Después del tratamiento con CDI  $1.10^{-3}$  M a la misma temperatura durante 1,5 horas se han incubado los derivados en un medio al mismo pH con NaCl 0,5 M para favorecer la desorción de las moléculas de proteína que no se hubiesen unido covalentemente al soporte, después de lo cual el rendimiento final de la inmovilización ha sido calculado: 26, 12 y 5%, respectivamente sobre los soportes de grado de activación 75, 30 y 15  $\mu$ moles de grupo por ml gel.

Los tres derivados obtenidos se ensayaron frente al substrato sintético en condiciones estándar y en un medio con alta fuerza iónica para deshacer las posibles interacciones electrostáticas entre la fracción de grupos *amino* del soporte que, en las condiciones del ensayo (pH 4,7) se encuentren ionizados y los grupos *carboxilo* superficiales de la enzima que no han reaccionado covalentemente. En la tabla I.2 se puede ver que todos los derivado conservan la actividad hidrolítica las moléculas inmovilizadas, siempre que se eliminen las interacciones electrostáticas enzima soporte. Son los *derivados B* y *C* los que conservan mayor actividad (70-67% frente al 44% del *derivado A*) cuando la interacciones iónicas tiene lugar, debido precisamente a que son los que poseen sobre su superficie menor densidad de grupos reactivos y, por tanto ionizables, lo cual permite menor multiinteracción iónica entre las moléculas inmovilizadas y el soporte.

Se ha estudiado también la actividad de estos derivados frente a la caseína  $\kappa$  usando la solución de substrato estándar y la solución de substrato con alta fuerza iónica. Los resultados se representan en la tabla I.3.

A pesar de que la actividad de la enzima inmovilizada sobre estos soportes, medida frente al substrato pequeño, se mantiene intacta, su actividad frente al macrosustrato, también en ausencia de interacciones electrostáticas, disminuye enormemente (5,63, 7,14 y 4,76 %). El efecto de la multiinteracción electrostática es independiente de la densidad de grupos reactivos del soporte.

Esta nueva orientación conferida a la enzima permite obtener derivados tres veces más activos que los preparados sobre soporte glioxil-agarosa (Apartado 3.1.1), si bien estos derivados enzimáticos obtenidos por inmovilización sobre soporte MANA-agarosa tienen poca actividad coagulante de caseína  $\kappa$ .

DERIVADO	grado activación soporte (a)	A.C.R. (%) (b)	
		(c)	(d)
A	75	7,78	5,63
B	30	3,45	7,14
C	15	2,78	4,76

Condiciones experimentales: las mismas de la tabla I.2.

(a)  $\mu$ moles de grupos amino primarios por ml de gel.

(b) Actividad Coagulante Remanente: Actividad coagulante ensayada con respecto su actividad hidrolítica ensayada en cada derivado.

(c) Solución de sustrato estándar.

(d) Solución de sustrato con NaCl 0,5 M.

**Tabla I.3.** Actividades remanentes hidrolítica y coagulante de los derivados enzimáticos de renina de *Mucor miehei* preparados por inmovilización sobre los soportes MANA-agarosa.

### 3.1.3. INMOVILIZACION A TRAVES DE LOS GRUPOS AMINO DE BAJO pK DE LA ENZIMA SOBRE SOPORTE GLUTARALDEHIDO-AGAROSA

La gran reactividad de los soportes activados con *glutaraldehído* permite que a pH neutro los grupos *amino* de pK bajo, como el *amino terminal* de la cadena peptídica, y posiblemente algún otro que por su disposición en la estructura pudiera ver reducido su pK, puedan atacar nucleofílicamente dichos grupos del soporte y dar lugar a enlaces irreversibles (*Introducción, Apartado 1*).

Para la preparación de los derivados de renina inmovilizada sobre *soportes glutaraldehído-agarosa* se han elegido las condiciones de reacción que permiten la inmovilización menos intensa, de modo que la actividad hidrolítica del hexapéptido no se vea afectada por la inmovilización, suavizando progresivamente todas las variables que afectan al proceso: densidad de grupos reactivos del soporte, pH del medio, temperatura y duración de la interacción. En la tabla I.4 se recogen las condiciones de preparación y los resultados de actividad enzimática remanente de algunos de los derivados preparados.

La utilización de un soporte poco activado (5  $\mu$ moles de grupos reactivos por ml de gel) y en un medio en el que el pH confiere baja reactividad a los grupos implicados

en la unión, ha permitido la inmovilización de suficiente cantidad de enzima con una actividad coagulante remanente que alcanza el 33% de la actividad con respecto a la enzima soluble con la misma actividad hidrolítica.

grado activación soporte (a)	pH	T <sup>a</sup> (°C)	t (h)	Rend <sub>INM</sub> (b)	A.H.R. (%) (c)	A.C.R. (%) (d)
75	7,5	4	0,5	91	13	2,78
30	7,5	4	0,5	93	16	2,5
30	6,5	4	0,5	93	21	5,1
5	7,5	20	1	53	28	33,3
5	6,5	10	8	34	14	33.3

(a)  $\mu$ moles de grupos reactivos por ml de gel.

(b) Cantidad de enzima inmovilizada covalentemente con respecto a la cantidad de enzima ofrecida y activa en las condiciones de incubación. Cantidad de enzima ofrecida inicialmente: 45 mg extrato comercial/ml gel.

(c) Actividad Hidrolítica Remanente: Actividad hidrolítica ensayada con respecto a la cantidad de enzima inmovilizada en cada derivado.

(d) Actividad Coagulante Remanente: Actividad coagulante ensayada con respecto a la actividad hidrolítica ensayada en cada derivado.

**Tabla I.4.** Influencia de diferentes factores en la optimización de derivados enzimáticos de renina de *Mucor miehei* preparados por inmovilización sobre los soportes glutaraldehído-agarosa

La Actividad Coagulante Remanente (%) se calcula en relación a la actividad hidrolítica que muestra el derivado, al no haberse optimizado la actividad hidrolítica remanente del derivado (28%), la actividad coagulante en relación a la cantidad de proteína inmovilizada es del 9,3%; es decir el derivado ha sufrido un 72% de pérdida de actividad manifestada cuando se une específicamente al sustrato pequeño y con respecto a esta actividad remanente una caída adicional del 66%.

Los resultados indican que, se ha realizado un control sobre el proceso con el fin de que cada molécula de enzima que se inmovilizara lo hiciera del modo que menos afectara su estructura terciaria y por lo tanto su actividad, sin embargo este control no ha permitido la obtención de un derivado con muy buena actividad cuando se ensaya frente al sustrato de menor tamaño.

Para buscar una posible explicación hay que analizar el mecanismo de la estrategia de inmovilización: en primer lugar esta estrategia está dirigida a la participación en la reacción con el soporte de aquellos grupos *amino* de pK bajo de la proteína, como es el caso del *amino terminal* o algún otro residuo que, por efectos de inducción de grupos próximos, pudieran haber modificado su pK; en segundo lugar, aún en el caso de existir en cada molécula de enzima varios grupos con posibilidades de reaccionar, la baja densidad superficial de grupos sobre el soporte no permitiría muchas uniones con cada una. Por lo tanto, pocos grupos de la molécula estarían participando en la inmovilización y en consecuencia estos derivados no podrían haber sufrido grandes distorsiones de conformación activa por la interacción con el soporte, lo que sí que podría haber ocurrido es la implicación en la interacción con el soporte de algún grupo esencial para la actividad catalítica y de ahí la imposibilidad de lograr la optimización de la actividad enzimática frente al hexapéptido a pesar del control de todos los factores de los que depende la intensidad de la interacción.

#### **3.1.4. INMOVILIZACION A TRAVES DE LAS CADENAS GLICOSIDICAS DE LA GLICOENZIMA SOBRE SOPORTE MANA-AGAROSA**

Por ser la enzima objeto de estudio una glicoproteína, a estos tres métodos de inmovilización covalente, extensibles, en general, a cualquier proteína, se ha de añadir uno más: el aprovechamiento de las cadenas de azúcares que se encuentran asociadas a la fracción proteica, como zona de unión al soporte.

##### **► Efecto de la semipurificación y posterior oxidación con $\text{NaIO}_4$ sobre la actividad y estabilidad de la enzima en solución**

La naturaleza glicoproteica de muchas enzimas permite la utilización de sus cadenas de azúcares como brazo de unión al soporte. La necesidad de oxidación previa como modo de activación de dichas cadenas, hace necesario el análisis del efecto que causa este proceso sobre la enzima en solución para determinar la viabilidad de la aplicación de la estrategia sobre la enzima a estudiar.

El extracto de renina de *Mucor miehei* no se encuentra disponible con alto grado de pureza, por ello se ha considerado oportuno proceder previamente a la introducción

de alguna etapa de semipurificación, en la cual se eliminan azúcares libres que pudieran estar presentes y que supondrían importantes interferencias a la hora de oxidar la glicoproteína. El proceso elegido ha consistido en la adsorción selectiva al soporte *MANA-agarosa*, seguida de un lavado que asegure la eliminación de todo aquello que no se haya unido al soporte y la posterior desorción por incremento de la fuerza iónica (en *Métodos*).

Después del proceso de semipurificación la solución obtenida conservó toda la actividad enzimática (95%), sin embargo su contenido en proteína total ha disminuido hasta un 50%. Estos resultados indican que no sólo se han eliminado aquellas impurezas no proteicas como sales o azúcares libres, sino también parte de las proteínas presentes en el extracto crudo diferentes de la renina que por lo tanto no mostraban actividad enzimática. El resultado es una solución enzimática semipurificada con un actividad específica de 1,2-1,5 U.A.H./mg proteína.

\* \* \*

Una vez semipurificada la solución enzimática se procede al tratamiento con  $\text{NaIO}_4$  con el fin de oxidar las cadenas glicosídicas de la enzima y con ello lograr la activación necesaria para que pueda tener lugar la interacción con el soporte *MANA-agarosa*. El consumo máximo de  $\text{NaIO}_4$  es de 3,8  $\mu\text{moles}$  de oxidante por cada mg de proteína del extracto semipurificado. La solución después de la oxidación muestra un 52% de la actividad hidrolítica inicial y un 42% de su actividad coagulante. Esto indica que la modificación química afecta considerablemente a la actividad enzimática frente a ambos substratos, siendo algo mayor la inactivación producida con respecto a la hidrólisis de caseína  $\kappa$ . No sólo la actividad enzimática se ve afectada por la oxidación, también disminuye su estabilidad. Así la alcalinización del medio hasta pH 10,0, pH al cual ha de tener lugar la reacción de la enzima oxidada con el soporte, hace que la actividad enzimática caiga progresivamente durante el tiempo que dura la inmovilización (inmediatamente que cambia el pH del medio la actividad cae un 20% con respecto al valor que mostraba finalizada la oxidación).

Debido a la intensidad con la que la oxidación afecta a la actividad y a la estabilidad de la enzima, se ensayaron tratamientos más suaves. Se ofrecieron concentraciones menores de  $\text{NaIO}_4$  con las cuales conseguir grados de oxidación del 65, 30 y 15% con respecto al valor máximo de oxidante consumido. Los valores de actividad hidrolítica remanente obtenidos fueron del 81, 90 y 95% con respecto a la inicial, y en



todos los caso la estabilidad fue buena (95-100%) a pH 10,0 y 4°C, durante el tiempo que duró la inmovilización.

\* \* \*

Todos los derivados de renina se han preparado a partir de una solución semipurificada del extracto siguiendo la estrategia de inmovilización descrita en *Métodos*.

Se han preparado dos derivados utilizando un soporte activado al máximos en los que la diferencia entre ambos ha sido el grado de oxidación de las cadenas glicosiladas de la enzima. En la tabla I.5 se recoge que la oxidación al 90% aumenta considerablemente el rendimiento de la inmovilización llegando a inmovilizarse la práctica totalidad de la enzima ofrecida a un soporte activado al máximo (*derivado C*), frente al 27% que se insolubiliza de la enzima oxidada al 15% (*derivado B*), lo mismo que se une al soporte activado con 15  $\mu$ moles/ml gel, cuando la enzima se oxida al 30% (*derivado A*). La utilización de un soporte ionizable en las condiciones del ensayo enzimático hace indispensable la comparación de las actividades remanentes de los derivados en presencia de alta concentración de sales para evaluar la insolubilización evitando el posible efecto de la multiinteracción iónica. Cuando el ensayo de A.H.R. de los derivados obtenidos se realiza en un medio con alta fuerza iónica se recupera en todos los casos la actividad de las moléculas inmovilizadas. El derivado que conserva mayor actividad en el medio estandar es el preparado por inmovilización sobre un soporte de baja activación (*derivado A*) que permite conservar el 74% de la actividad hidrolítica. En los derivados B y C los grupos ionizables del soporte son los mismos, pues su grado de activación es el mismo, y los grupos ionizables de la enzima que pueden interaccionar con los primeros (*Asp* y/o *Glu*) también son los mismos por molécula, sin embargo la actividad hidrolítica cae un tercio debido a la multiinteracción electrostática es casi del doble cuando la enzima inmovilizada se ha sido oxidada al 90% con respecto a la enzima oxidada al 15%. La pérdida de actividad por multiinteracción electrostática es del 33% en el primer caso y del 52% en el segundo. La explicación de este comportamiento podría ser que en el derivado C las moléculas de enzima se encuentran unidas al soporte a través de más puntos por lo cual la fracción proteica está más próxima a la superficie del soporte y también los residuos ionizados y por ello la interacción electrostática está más favorecida que en el derivado B en el que la baja activación de las cadenas glicosiladas quizás no de lugar a muchas uniones covalentes con el soporte y por lo tanto la fracción proteica se encuentre más alejada de éste.

DERIVADO	grado activación soporte (a)	grado <sub>OX</sub> (%) (b)	Rend <sub>INMV</sub> (%) (c)	A.H.R. (%) (d)	
				(e)	(f)
A	15	30	23	74	~100
B	75	15	27	67	~100
C	75	90	97	48	~100

(a)  $\mu$ moles de grupos reactivos por ml de gel.

(b) Grado de oxidación de la disolución de extracto enzimático semipurificada.

(d) Cantidad de enzima inmovilizada covalentemente con respecto a la cantidad de enzima ofrecida y activa en las condiciones de incubación. Cantidad de enzima ofrecida inicialmente: ... mg extrato comercial/ml gel.

(e) Actividad Hidrolítica Remanente. Actividad hidrolítica ensayada con respecto a la cantidad de enzima inmovilizada en cada derivado.

(f) Solución de sustrato estándar.

(g) Solución de sustrato con NaCl 0,5 M.

**Tabla I.5.** Influencia de diferentes factores en la optimización de derivados enzimáticos de renina de *Mucor miehei* preparados por inmovilización sobre los soportes MANA-agarosa a través de sus cadenas glicosídicas previamente oxidadas.

En la tabla I.6 se muestran los resultados de Actividad Coagulante obtenidos. El control de las condiciones de inmovilización ha permitido obtener derivados con un 15% de actividad coagulante remanente (derivados A y B). Los valores de actividad coagulante recuperada de estos derivados los convierten en los más activos de los obtenidos con esta enzima en lo que respecta a la medida frente a su sustrato natural. Cuando la multiinteracción con el soporte no se controla, como es el caso del derivado C, a pesar de que se no pierde actividad hidrolítica la caída de actividad frente a caseína  $\kappa$  es grande conservando sólo un ~2% de su actividad caseinolítica.

Lo mismo que ocurre en los derivados preparados sobre el mismo soporte pero por inmovilización covalente a través de la fracción proteica (Apartado 3.1.2) la fuerza iónica no afecta al porcentaje de Actividad Coagulante con respecto a la que debería tener la enzima soluble en las mismas condiciones.

DERIVADO	A.C.R. (a)	
	(b)	(c)
A	16,7	15,4
B	15,9	14,3
C	2,2	1,6

(a) *Actividad Coagulante Remanente. Actividad coagulante ensayada con respecto a la cantidad de enzima inmovilizada en cada derivado en las condiciones indicadas.*

(b) *Solución de sustrato estándar.*

(c) *Solución de sustrato con NaCl 0,5 M.*

**Tabla I.6.** Actividad coagulante remanente de los derivados enzimáticos de renina de *M. miehei* preparados por inmovilización covalente sobre los soportes MANA-agarosa a través de sus cadenas glicosídicas previamente oxidadas.

Los derivados A y B son los que conservan un mayor actividad coagulante habiendo sido preparados con un soporte poco activado, en el primer caso, y con bajo grado de oxidación de la enzima en el segundo caso. No obstante cuando la enzima se encontraba activada al 90% y la inmovilización tuvo lugar sobre un soporte activado al máximo, la actividad coagulante fue muy baja indicando que la mayor multiinteracción puede provocar el acercamiento de la zona proteica al soporte y aumentar los impedimentos estericos para la entrada de la caseína. Los resultados obtenidos manifiestan que incluso en este caso en el que la inmovilización de la enzima está teniendo lugar por reacción de las cadenas glicosídicas lo cual supone la separación de la zona proteica del soporte, la mutiinteracción perjudica enormemente en cuanto a la actividad frente al sustrato macromolecular.

En resumen se puede apuntar que el aprovechamiento de las cadenas de azúcares como zona de interacción con un soporte tipo superficie, no sólo sería una estrategia adecuada por tratarse de una glicoproteína sino por que el grupo prostético (polisacáridos) actuarán como brazo espaciador alejando del soporte a la fracción polipeptídica, en la que se incluye la zona de reconocimiento específico del sustrato. Esto favorece el acceso del sustrato macromolecular al centro activo, siempre que se cuide las condiciones de inmovilización de modo que la interacción con el soporte no sea tan intensa que suponga el acercamiento la soporte de la fracción proteica.

### 3.2. Segunda estrategia: UTILIZACION DE SOPORTES CON DIFERENTE MORFOLOGIA INTERNA (*Toyopearl*, *Eupergit* y *Biosynth*)

La morfología interna del soporte sobre el que se encuentra insolubilizada una enzima va a influir en un gran número de procesos como la difusión de sustratos y productos, el grado de interacción enzima-soporte, la estabilización adicional provocada por dicha interacción, etc.. Por ello la elección del soporte en función de su morfología deberá adquirir una importancia decisiva en el caso de derivados que actúan frente a sustratos macromoleculares, ya que los problemas de accesibilidad al centro activo de la enzima por parte de la molécula de sustrato se verán incrementados al aumentar la congruencia geométrica enzima-soporte.

La utilización de soportes con una morfología interna más abierta es la segunda estrategia propuesta para la inmovilización de enzimas con condicionantes espaciales para la unión específica de su sustrato voluminoso. Para su estudio se ha recurrido a la utilización de diferentes soportes poliméricos: agarosa 6B-CL, agarosa 10B, *Toyopearl*, *Eupergit* y *Biosynth*. La primera parte del trabajo desarrollado ha consistido en una somera **caracterización de los "nuevos" soportes** en cuanto a lo que se ha denominado "congruencia geométrica" entre el soporte y la enzima. Para poder clasificar en términos relativos la *congruencia geométrica* de estos soportes de un modo sencillo y utilizando las técnicas disponibles, se ha realizado un estudio basado en el supuesto de que si se preparan derivados por inmovilización sobre diferentes soportes activados con el mismo tipo e idéntica densidad de grupos reactivos por cada molécula de enzima insolubilizada, la posibilidad de multiinteracción será mayor cuanto mejor sea el *acoplamiento geométrico* entre ambos. Este grado de multiinteracción en la inmovilización covalente se reflejará en dos características del derivado: la posible *pérdida de actividad* causada por la distorsión de la molécula de enzima que se ha unido por mayor número de puntos y/o la posible *ganancia de estabilidad* con respecto a la enzima en solución causada por la rigidificación de la estructura 3D de la enzima al haberse unido por mayor número de puntos al soporte.

El proceso seguido consiste en la preparación de derivados enzimáticos sobre soportes activados al máximo con el mismo grupo reactivo (*glioxilo*) para determinar la cantidad máxima de grupos reactivos del soporte por cada molécula de enzima o por cada mg de enzima. A continuación se eligió un mismo valor de esta relación y se activaron los soportes con un grado de activación tal que al inmovilizar la enzima sobre

ellos presenten dicho valor de densidad de grupos reactivos por molécula de enzima (por mg de enzima), evitando los problemas de difusión a la hora de ensayar sus actividades. Sobre estos últimos derivados se estudian las diferencias en el grado de multiinteracción permitido por los diferentes soportes, manifestadas (i) en diferencias en la actividad remanente durante el proceso de inmovilización, y/o (ii) en diferencias de estabilidad térmica de los derivados enzimáticos obtenidos incubados en diferentes condiciones después de la unión covalente

Para desarrollar este estudio se ha utilizado tripsina por ser una enzima monomérica, no glicosilada, de ~40.000 D y que ha permitido una buena inmovilización al soporte *glioxil-agarosa*, habiéndose calculado que en la inmovilización covalente a dicho soporte se llegan a formar 7 enlaces por molécula (8).

### 3.2.1. DETERMINACION DEL GRADO DE CONGRUENCIA GEOMETRICA DE SOPORTES CON DIFERENTE MORFOLOGIA INTERNA

Se han preparado derivados cargados al máximo con tripsina para determinar la *densidad específica máxima de grupos reactivos del soporte en relación con la cantidad de tripsina inmovilizada* ( $\mu\text{moles máximos de grupos reactivos/mg tripsina}$ ). La finalidad de estos derivados es elegir el grado de activación "óptimo" para cada soporte que permita preparar derivados con idéntica densidad específica y, por lo tanto, comparables entre sí, y en los que la actividad enzimática no se vea afectada por problemas de difusión.

La tabla I.7 recoge los valores resultantes de la preparación de derivados sobre cada uno de los soportes activados totalmente (a) habiendo insolubilizado la máxima cantidad de tripsina que ha aceptado cada uno (b), lo cual ha servido para el cálculo de lo que se ha denominado *densidad específica máxima del derivado* que no es más que la relación entre (a) y (b), es decir los  $\mu\text{moles}$  de grupos glioxilo del soporte que corresponden a cada mg de tripsina insolubilizado en un ml de gel.

Soporte	Activación máxima del soporte (a)	Capacidad máxima de carga del soporte (b)	Actividad remanente (%) (c)	Densidad específica máxima del derivado (d)
TOYOPEARL	80	28	100	2,9
AGAROSA 6%	75	54	59	1,4
AGAROSA 10%	200	115	30	1,7
EUPERGIT	190	65	45	2,9
BIOSYNTH	130	76	30	1,7

(a)  $\mu$ moles de grupos glioxilo por ml de soporte húmedo.

(b) mg de enzima (tripsina) inmovilizada por ml de soporte húmedo.

(c) Actividad enzimática residual del derivado de tripsina con respecto a la de la cantidad de enzima que se ha inmovilizado.

(d)  $\mu$ moles de grupos glioxilo sobre el soporte por mg de proteína inmovilizado.

**Tabla I.7.** Derivados de tripsina preparados por inmovilización sobre los *glioxil-soportes* con la máxima cantidad de enzima admitida por cada soporte.

Para obtener unos derivados enzimáticos con idéntica densidad específica de grupos reactivos del soporte por mg de enzima se ha de disminuir el grado de activación de los soportes *Toyopearl* hasta 37,5 y *Eupergit* hasta 75  $\mu$ moles glioxilo/ml gel, de este modo todos los derivados preparados tendrán una relación  $\mu$ moles grupos glioxil/mg proteína en el intervalo 1,4-1,7. En la tabla I.8 se recogen los derivados que se han preparado y que permitirán el posterior estudio de las posibilidades de multiinteracción que presenta cada soporte para las moléculas de enzima insolubilizadas sobre ellos, el significado de estos derivados es que cada molécula de enzima inmovilizada posee bajo ella el mismo número de grupos *glioxilo* del soporte por lo cual las posibilidades de interaccionar con todos ellos o con uno solo dependerán de la disposición espacial de estos grupos y su relación con los grupos de la enzima.

Soporte	Activación del soporte (a)	Densidad específica del derivado (b)	Carga enzimática (c)(d)
TOYOPEARL	37,5	1,5	12,9
AGAROSA 6%	75	1,4	19
AGAROSA 10%	200	1,7	17
EUPERGIT	75	1,5	18
BIOSYNTH	130	1,8	20,2

(a)  $\mu$ moles de grupos glioxilo por ml de soporte húmedo.

(b)  $\mu$ moles de grupos glioxilo sobre el soporte por cada mg de proteína inmovilizado.

(c) cantidad de enzima inmovilizada (sin problemas de difusión): mg. enzima inmovilizada (tripsina) por ml de soporte húmedo.

(d) Según se ha deducido de los derivados de máxima carga enzimática recogidos en la tabla I.8 las concentraciones inmovilizadas (c) no presentan problemas de difusión.

**Tabla I.8.** Derivados de tripsina preparados sobre los diferentes glioxil-soportes con idéntica densidad específica de grupos reactivos por molécula de proteína inmovilizada.

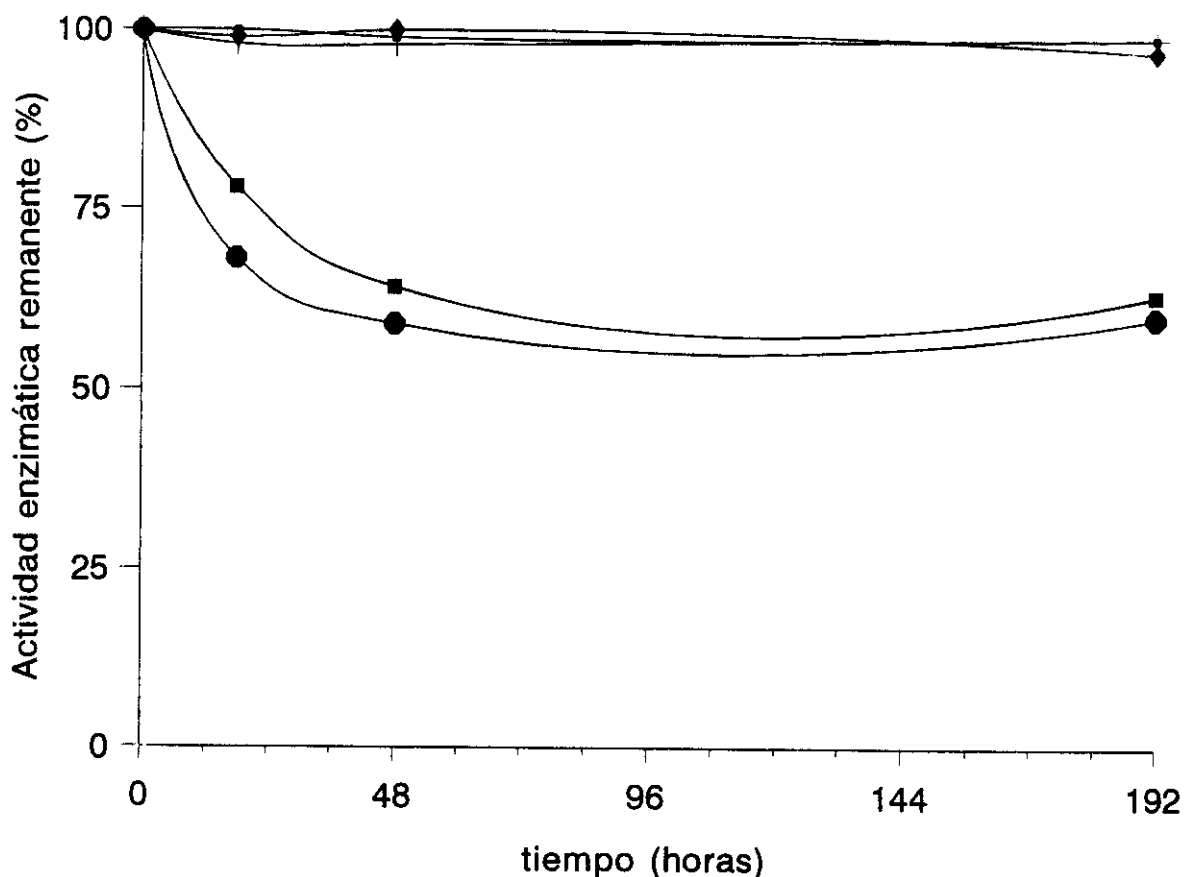
#### ► Estudio de las posibilidades de multiinteracción de cada soporte

Determinados los valores adecuados de grado de activación del soporte y de carga enzimática para cada derivado preparado con un soporte diferente, se procedió al estudio de la multiinteracción soporte-tripsina.

El proceso de inmovilización seguido se divide en dos etapas: en la primera etapa tiene lugar la insolubilización de la enzima ofrecida en presencia de *benzamidina* como inhibidor para evitar fenómenos de autólisis. Una vez finalizada la insolubilización y eliminado el inhibidor enzimático por lavado del gel, se continúa la incubación en las mismas condiciones de pH para favorecer una interacción más intensa de cada una de las moléculas inmovilizadas con el soporte y se procede al seguimiento de la actividad enzimática de cada derivado en función del tiempo transcurrido.

En la figura I.12 se muestra el seguimiento de la actividad de los derivados de tripsina ya insolubilizada incubados en condiciones favorables para la multiinteracción con el soporte. Según se puede observar, los derivados preparados sobre agarosa son los

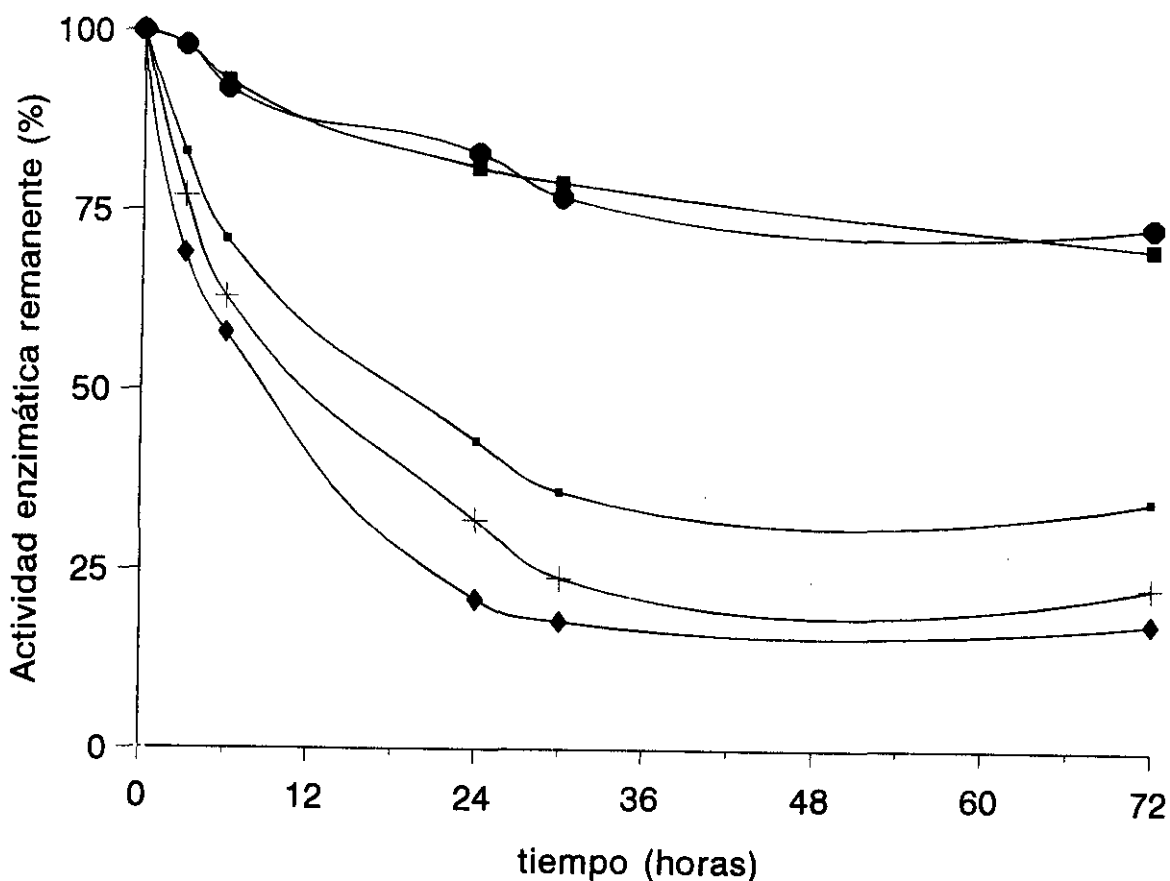
únicos a los que la incubación enzima-soporte provoca una caída progresiva de actividad, lo que indica que se ha producido multiinteracción con el soporte que distorsiona la molécula de proteína haciendo que pierda capacidad catalítica. La incubación sobre los otros soportes no afecta a su actividad, lo cual indica la multiinteracción no ha tenido lugar o que la que tiene lugar no es suficiente para afectar a la conformación activa de la molécula de catalizador.



**Figura I.12.** Curso del proceso de multiinteracción de tripsina con el soporte sobre el que se encuentra inmovilizada. Substrato utilizado: BAEE ( $N\alpha$ -benzoyl-L-arginina-etil-éster). Condiciones experimentales en *Métodos, Apartado 2.2*. Soportes: Toyopearl (■), Eupergit (+), Biosynth (◆), agarosa 6B-CL (■) y agarosa 10B (●).

Para estudiar si la incubación prolongada de la enzima insolubilizada se manifestaría en algún cambio en la estabilidad térmica de los diferentes derivados obtenidos, se realizaron incubaciones a pH 10 y 50°C (figura I.13).





**Figura I.13.** Cursos de inactivación térmica de derivados de tripsina preparados por inmovilización covalente sobre glioxil-soportes. Condiciones experimentales en *Métodos*, Apartado 5.2. Soportes: *Toyopearl* (□), *Eupergit* (+), *Biosynth* (◆), agarosa 6B-CL (■) y agarosa 10B (●).

Se puede observar una clara diferencia de estabilidad para los cada tipo de soporte. Los valores de semivida extrapolados de las curvas de inactivación van desde ~10 horas para los derivados preparados sobre *Eupergit* o *Biosynth*, ~18 horas sobre gel *Toyopearl*, hasta más de 72 horas cuando la inmovilización ha tenido lugar sobre agarosa 6B-CL ó 10B.

Tanto estos resultados de estabilidad como los obtenidos anteriormente en relación a la pérdida de actividad, debidos ambos a la multiinteracción enzima-soporte confirman que los soportes *Toyopearl*, *Eupergit* y *Biosynth* permiten una menor congruencia geométrica con las proteínas. Teniendo el mismo número de grupos reactivos bajo cada molécula de enzima inmovilizada la disposición de estos es tal que

no pueden tener lugar interacciones que distorsionen o rigidifiquen la estructura terciaria activa de la enzima. La disposición de los grupos reactivos en el soporte estará determinada por la morfología interna de éste. Entre los tres soportes parece que *Toyopearl* ha permitido una estabilización ligeramente superior, por lo que se podría preveer una estructura algo más cerrada que permitiría algún punto de unión más.

### 3.2.2. CONTROL Y OPTIMIZACION DE LA INMOVILIZACION DE RENINA SOBRE SOPORTES DE MENOR CONGRUENCIA GEOMETRICA

De los estudios previos de inmovilización de renina de *Mucor miehei* sobre agarosa 6B-CL (*Apartado 3.1*), se concluyó que la orientación que daba lugar a los derivados con peor actividad frente al sustrato macromolecular es la originada por unión al soporte *glioxil-agarosa*. Por ello, se ha elegido esta estrategia de inmovilización para ser ensayada con los soportes que muestran menor congruencia geométrica con la proteína que con ellos interaccione: *Eupergit*, *Biosynth* y *Toyopearl*.

#### ► Inmovilización de renina de *Mucor miehei* a través de sus grupos amino superficiales (Lys) sobre soportes activados con grupos *glioxilo*

El proceso seguido para la inmovilización ha sido el mismo empleado con el soporte de agarosa, cuidando al máximo las condiciones de reacción con el fin de reducir las posibilidades de distorsión de las moléculas de enzima inmovilizadas (que inicialmente se manifestará en caídas de actividad frente al sustrato sintético). Ha sido *Biosynth* el soporte que ha dado mejores resultados (Tabla I.9).

El derivado preparado sobre este soporte activado con 30  $\mu$ moles de grupos por ml gel, a 4°C durante 5 horas ha permitido la unión poco distorsionante del 6% de la enzima ofrecida, cantidad suficiente para poder comprobar que este derivado conserva el 25,1% de su actividad coagulante.

Los derivados optimizados preparados sobre *Eupergit-75* (la inmovilización se realizó a 4°C, con un tiempo de interacción de 4-21 horas) conservan también toda su Actividad Hidrolítica, y muestran una Actividad Coagulante del 14,5%.

grado activación soporte (a)	T <sup>a</sup> (°C)	t (h)	Rend <sub>INM</sub> (%) (b)	A.H.R. (%) (c)	A.C.R. (%)(d)
30	4	5	6	~100	25,1
137	4	5	32	~100	12,5
137	20	4	100	9	6,6

(a)  $\mu$ moles de grupos reactivos por ml de soporte húmedo.

(b) Cantidad de enzima inmovilizada con respecto a la cantidad de enzima ofrecida y activa en las condiciones del proceso. Cantidad de enzima ofrecida inicialmente: 50 mg de extracto comercial/ml soporte.

(c) Actividad Hidrolítica Remanente: Actividad hidrolítica ensayada con respecto a la cantidad de enzima inmovilizada en cada derivado.

(d) Actividad Coagulante Remanente: Actividad coagulante ensayada con respecto a la actividad hidrolítica ensayada en cada derivado.

**Tabla I.9.** Derivados de renina de *Mucor miehei* preparados por inmovilización sobre soporte *glioxil-Biosynth*.

El sistema de activación del soporte consiste en grupos *glioxilo* idénticos a los de agarosa, con la cual el valor máximo de Actividad Coagulante Residual obtenida era del 2,5%. Los nuevos soportes han permitido obtener derivados enzimáticos con 10 y 6 veces más actividad coagulante remanente de la que se logra sobre agarosa, siendo en todos los casos la misma orientación preferente de la enzima, dada por el mismo tipo de grupos reactivos sobre el soporte: *aldehído*.

La utilización de *Toyopearl* ha permitido rendimientos de inmovilización muy bajos, insuficientes para poder considerar reproducibles los valores de actividad obtenidos.

#### ► Inmovilización de renina de *Mucor miehei* a través de sus cadenas glicosílicas sobre *MANA-soportes*

Se procedió a la inmovilización de la enzima a estos nuevos soportes a través de las cadenas de azúcares por haber resultado ser la orientación óptima para la inmovilización de esta enzima sobre agarosa, según se muestra en el *Apartado 3.1.4*. La intención es conseguir sumar los efectos positivos de la aplicación de cada una de las dos

estrategias de inmovilización sobre la misma enzima. Los resultados de los derivados preparados se exponen en la tabla I.10.

Soporte	(a)	(b)	Rend <sub>INM</sub> (%) (c)	A.H.R. (%) (d)	A.C.R. (%) (e)	
					(f)	(g)
<i>EUPERGIT</i>	75	15	22	~100	25	33
<i>BIOSYNTH</i>	98	15	7	~100	25	28
AGAROSA 6%	75	15	27	~100	15,9	14,3

(a) Grado de activación del soporte ( $\mu$ moles de grupos glioxilo/ml soporte)

(b) Grado de oxidación de la glicoenzima respecto al máximo (%).

(c) Actividad Hidrolítica Remanente. Actividad hidrolítica ensayada, en ausencia de interacciones electrostáticas, con respecto a la cantidad de enzima inmovilizada en cada derivado.

(d) Actividad Coagulante Remanente: Actividad coagulante ensayada con respecto a la actividad hidrolítica de cada derivado.

(e) Solución de sustrato estándar.

(f) Solución de sustrato con NaCl 0,5 M.

**Tabla I.10.** Derivados de renina de *Mucor miehei* preparados sobre diferentes MANA-soportes previa oxidación de las cadenas glicosídicas de la enzima.

La inmovilización de renina a través de sus cadenas glicosídicas previamente oxidadas al 15% sobre los soportes *Eupergit* y *Biosynth* ha dado como resultado derivados que conservan toda su actividad hidrolítica siempre que se eliminen las interacciones electrostáticas debidas a la ionización del soporte en las condiciones del ensayo. Respecto a la actividad coagulante, los "nuevos" soportes permiten duplicar la actividad mostrada por inmovilización sobre agarosa, alcanzando el 28-33% de la actividad coagulante que tendría la misma cantidad de enzima si se encontrase en solución y no inmovilizada.

### 3.3. Tercera estrategia: UTILIZACION DE SOPORTES CON GRUPOS REACTIVOS CONVENIENTEMENTE DISTANCIADOS DE SU SUPERFICIE

Para reducir el impedimento estérico que supone la proximidad del soporte sobre el que se ha inmovilizado la enzima al acceso de sustratos voluminosos a su centro

activo, se ha propuesto la introducción de brazos espaciadores activos sobre los cuales se unan las moléculas a inmovilizar. De este modo se conservan las características físicas del soporte base (agarosa en el este caso), pero se disminuye la congruencia geométrica enzima-soporte por encontrarse los grupos reactivos del soporte separados de la superficie.

Se han elegido dos tipos de espaciadores:

- 1,4-butanodiol-diglicidoxi-éter (BDE) o 1,4-bis(2,3-epoxipropoxi)-butano (32), diepoxido de cadena larga que se ha elegido por su semejanza con el *glicidol* (2,3-epoxipropanol), agente utilizado en la activación de los geles de agarosa comerciales.

- Dextrano (polímero de glucosa). se ha elegido el dextrano de 10.000 D, buscando un polímero lineal de longitud suficiente para dar lugar largos brazos sobre la superficie del soporte cuya difusión por los poros de dicho soporte no esté limitada por su volumen.

### 3.3.1. UTILIZACION DE 1,4-butanodiol-diglicidoxi-éter (BDE) COMO AGENTE ESPACIADOR

#### ► Preparación y optimización de soportes BDE-agarosa

Por tratarse de un agente químicamente semejante al *glicidol*, el proceso de activación seguido fue básicamente el mismo, aunque hubo que tener en cuenta que la agarosa comercial posee radicales *epóxido* producto del entrecruzamiento con *epiclorhidrina*. Estos grupos darán lugar a grupos *aldehído* cuando el soporte activado con el agente elegido (*glicidol* o *BDE*) se oxide en la última etapa de activación. En el caso de la activación con *glicidol* no tendrá importancia pues las grupos obtenidos son idénticos a los resultantes de la activación. Sin embargo cuando el agente activante es *BDE* la oxidación del soporte activado tiene como resultado dos tipos de grupos reactivos: (i) los grupos *glioxilo* producto de la oxidación de los *glicoles* que posee la agarosa comercial (18  $\mu$ moles/ml gel) y (ii) los grupos *aldehído de cadena larga*, obtenidos por la oxidación del agente activante utilizado. Estos últimos serían los únicos grupos reactivos deseados sobre la superficie de la agarosa. Por ello, previamente a la

activación con BDE, fue necesaria la transformación los *glicoles* del soporte comercial en *hidroxilos* por oxidación y posterior reducción. De este modo, tras todo el proceso de activación, estos *hidroxilos* generados podrán reaccionar del mismo modo que los endógenos del soporte comercial.

Al ser el objetivo de este tipo de activación el conseguir evitar el posible efecto no deseado de la pared del soporte, el grado de activación ha de controlarse en la etapa de activación con BDE y no, como en el caso de la activación con *glicidol*, en la posterior etapa de oxidación, pues la presencia de un exceso de cadenas de BDE podría traducirse en un nuevo impedimento estérico a la entrada del sustrato en el centro activo de la enzima. Se han preparado dos soportes que se diferencian en la concentración de BDE utilizada durante la activación. El grado máximo de activación logrado en cada caso se ha determinado según la oxidación conseguida por tratamiento con  $\text{NaIO}_4$ : 18 y 90  $\mu\text{moles}$  grupos *aldehído* reactivos/ml gel BDE-agarosa. Estos valores de activación del soporte son algo mayores de los obtenidos con *glicidol* utilizando la misma concentración (7).

#### ► Estudio y control de la inmovilización

En la tabla I.11 se recogen los resultados de actividad de los derivados obtenidos por inmovilización a estos nuevos soportes.

[BDE] (M)	grado de activación (máximo) (%) (a)	A.H.R. (%) (b)	A.C.R. (%) (c)
0,2	18	~100	5,9
2	90	~100	1,4

(a)  $\mu\text{moles}$  de grupos reactivos por ml de soporte. Corresponde al máximo para cada uno de ellos.

(b) Actividad Hidrolítica Remanente: Actividad hidrolítica ensayada con respecto a la cantidad de enzima inmovilizada en cada derivado.

(c) Actividad Coagulante Remanente: Actividad coagulante ensayada con respecto a la actividad hidrolítica de cada derivado.

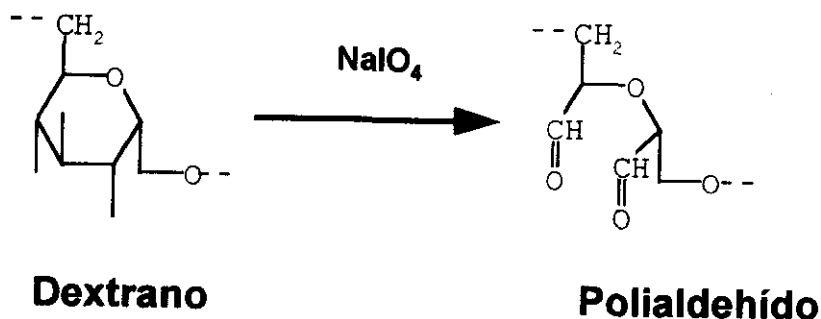
**Tabla I.11.** Derivados de renina de *Mucor miehei* preparados sobre soportes BDE-agarosa.

Los derivados resultantes presentan toda su actividad hidrolítica independientemente del grado de activación del soporte utilizado. Con respecto a su Actividad Coagulante Remanente, la densidad superficial de grupos reactivos del soporte influye significativamente. Así la enzima inmovilizada sobre el soporte menos activado conserva el 5,9% frente al soporte activado con BDE 2 M que permite recuperar sólo un 1,4%. Esto vuelve a demostrar que el control del grado de activación del soporte es importante cuando el sustrato requiere mayor disponibilidad estérica de la enzima, pues bien favorece la multiinteracción o bien supone un nuevo efecto pared sobre la enzima unida a través de estos brazos. Por otro lado los bajos valores de actividad coagulante resultantes apuntan a que no es suficiente una cadena de 12 átomos para conseguir la adecuada separación de la enzima con respecto al soporte y permitir el libre acceso del sustrato macromolecular al centro activo. Esto no sería de extrañar, si además consideramos que la orientación de la molécula de enzima es la que presenta mayores impedimentos.

### 3.3.2. UTILIZACION DE DEXTRANO COMO AGENTE ESPACIADOR

#### ► Preparación y optimización de los soportes *dextrano-agarosa*

El tratamiento de disoluciones de dextrano con  $\text{NaIO}_4$  como agente oxidante en condiciones suaves provoca la ruptura de los anillos monosacáridos dando lugar a dos grupos aldehído por anillo (33, 34). El resultado es la transformación de la cadena polisacárida en una cadena polialdehídica (Figura I.14).



**Figura I.14.** Proceso de oxidación de la molécula de dextrano por  $\text{NaIO}_4$ .

La cadena polialdehídica resultante es estable en medios neutros lo cual ha permitido el diseño de un método para la activación del soporte MANA-agarosa, en el que se utilizó como agente reductor el *trimetil-amino-borano (TMAB)*. Los complejos aminoborano son agentes reductores de bases de Schiff con una actividad óptima en medios neutros o ligeramente alcalinos (pH 6,0-9,0) y poco tóxicos si se comparan con otro agente de gran capacidad reductora en el mismo intervalo de pH como es el *cianoborohidruro* (35). Se ha elegido el complejo trimetilado frente al dimetilado debido a que dando lugar a idénticos rendimientos finales en reacciones de metilación de grupos *amino*, el primero muestra mayor vida media y capacidad reductora moderada, lo cual lo hace más aconsejado cuando el proceso sobre el que debe actuar ha de ser suave (36).

En la figura I.15 se representan esquemáticamente los dos procesos de activación con dextrano del soporte MANA-agarosa, que se describen a continuación:

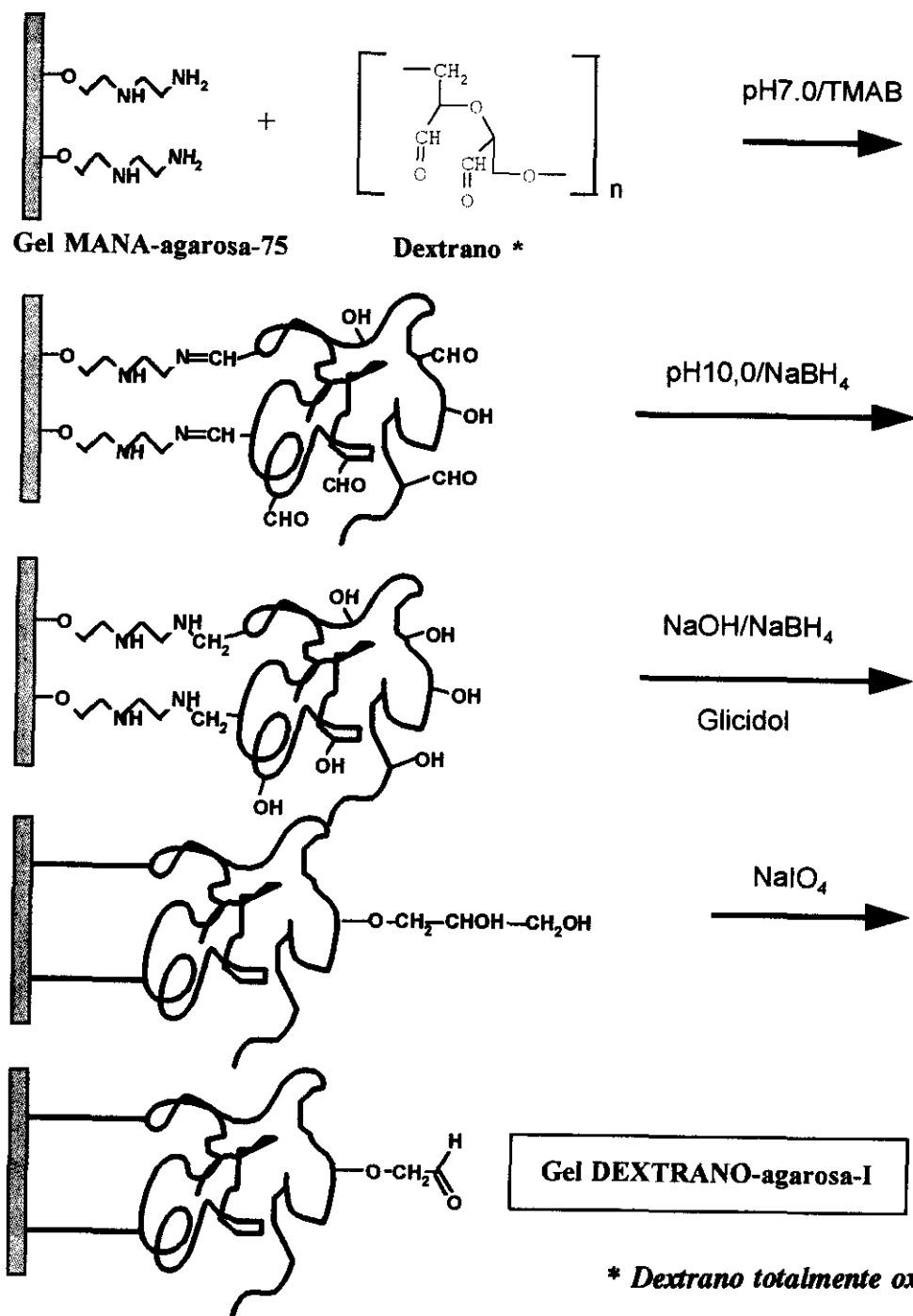
- El primero se obtuvo por reacción covalente de un gel de agarosa activado al máximo con grupos amino primarios (gel MANA-agarosa-75) con dextrano oxidado totalmente, y posterior tratamiento del *polihidroxil-soporte* resultante con glicidol. A este soporte se le ha denominado: **GEL DEXTRANO-AGAROSA-I**. En este caso la utilización de un *soporte MANA-agarosa* activado al máximo es imprescindible pues de encontrarse algún grupo activable de la agarosa comercial, reaccionaría con el glicidol a la vez que el propio dextrano, dando lugar a dos tipos de grupos reactivos, los del brazo de dextrano que recubre la agarosa propiamente dicha y los de la superficie del soporte. Si existe más de un tipo de grupos no se podría asegurar sobre cual tendrá lugar la inmovilización de la proteína.

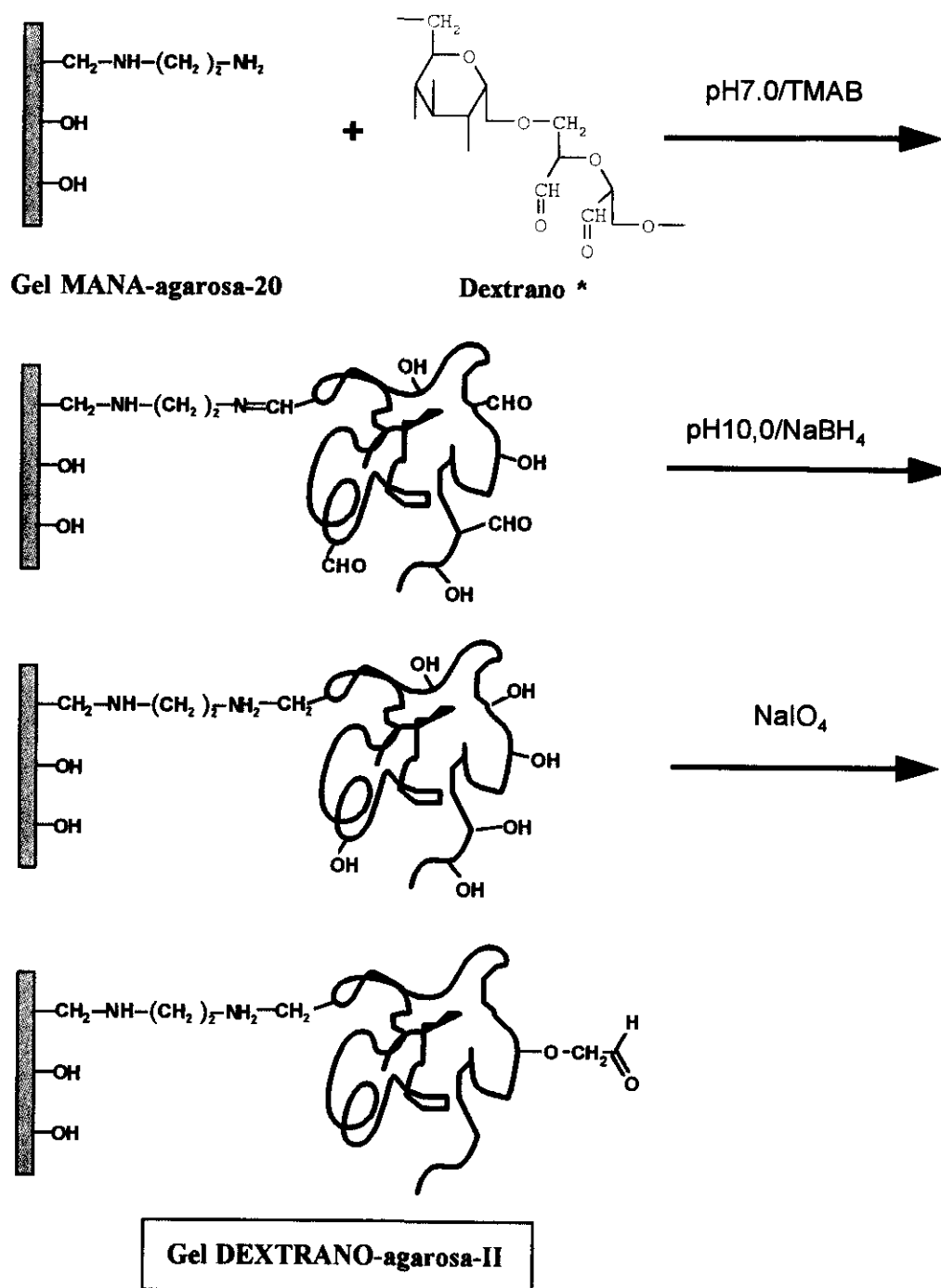
La oxidación del soporte obtenido tras la unión covalente del dextrano es la que conferirá al soporte el *grado de activación*, ya que en todos los casos la cantidad de dextrano que ha reaccionado es la máxima en las condiciones en que se llevó a cabo el proceso: 2,5  $\mu$ moles de dextrano/ml gel.

- El segundo tipo de soporte se ha obtenido a partir de un soporte MANA-agarosa de menor densidad de grupos reactivos superficiales (solamente se activan los grupos glicol obtenidos del soporte comercial por oxidación). No se activaron con glicidol los dextranos ya unidos al soporte (polihidroxil-soporte), pues también se activarían los grupos hidroxilo de la agarosa comercial lo cual hubiera supuesto la presencia de dos tipos de grupos reactivos en el soporte: unos directamente sobre la superficie del soporte



agarosa, no deseados, y otros sobre los brazos de dextrano unidos a él (objetivo del proceso). Por ello el dextrano utilizado en el tratamiento del soporte MANA-agarosa-20 estará parcialmente oxidado. Una vez que se haya unido covalentemente al soporte, la activación se consigue por oxidación directa de los residuos de dextrano que se encuentran sin modificar. A este soporte se le ha denominado: **GEL DEXTRANO-AGAROSA-II**.





*\* Dextrano parcialmente oxidado*

**Figura I.15.** Proceso de activación con dextrano del gel de agarosa con dextrano. (A) Partiendo del soporte con máxima densidad de grupos reactivos superficiales. (B) Partiendo de un soporte con baja densidad de grupos amino superficiales.

Se han obtenido diferentes soportes dextrano-agarosa-II atendiendo a dos variables. En primer lugar según el grado de oxidación parcial del dextrano ofrecido al gel MANA-agarosa-20 inicialmente para su "recubrimiento", y en segundo lugar en función de la oxidación final de los brazos de dextrano ya unidos covalentemente. Por ello se ha estudiado la influencia de ambos factores en la posterior inmovilización de la renina.

► Estudio y control de la inmovilización de renina de *Mucor miehei* sobre soportes dextrano-agarosa

Con el primer soporte disponible activado con dextrano, *dextrano-agarosa-I*, recubierto con 2,5  $\mu\text{mol}$  dextrano/ml gel, se estudió el efecto de parámetros como el grado de activación final del dextrano ya unido a agarosa (controlando la oxidación una vez tratado con glicidol), el tiempo de interacción enzima-soporte, la temperatura, etc., siempre con el fin de optimizar el derivado en cuanto a Actividad Hidrolítica y, de este modo, ver posibles efectos sólo frente al sustrato natural de gran volumen. En la tabla I.12 se representan las condiciones de preparación del derivado optimizado comparándolas con las de otro, que no permite la conservación de la actividad hidrolítica.

grado activación soporte	tiempo	Rend <sub>INMOV</sub>	A.H.R.	A.C.R.
(a)	(h)	(%) (b)	(%) (c)	(%) (d)
445 (máximo)	1	24	12	2.4
90 (al 20%)	4	11	100	4.8

(a)  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NaIO}_4$  consumidos/ml soporte (porcentaje de oxidación con respecto al máximo).

(b) Cantidad de enzima inmovilizada con respecto a la cantidad de enzima ofrecida y activa inicialmente.

(c) Actividad Hidrolítica Remanente. Actividad hidrolítica ensayada con respecto a la cantidad de enzima inmovilizada en cada derivado.

(d) Actividad Coagulante Remanente: Actividad coagulante ensayada con respecto a la actividad hidrolítica de cada derivado.

**Tabla I.12.** Derivados de renina de *Mucor miehei* preparados por inmovilización sobre los soportes dextrano-agarosa-I.

El derivado preparado por inmovilización sobre un soporte dextrano-agarosa-I en el que los brazos de dextrano introducidos han sido oxidados al 20 % ha sido optimizado con respecto a su actividad hidrolítica, mostrando un 4,8% de actividad coagulante remanente. Cuando el soporte utilizado es el de brazos espaciadores activados al máximo la caída de actividad enzimática frente al sustrato sintético es muy importante (88%), lo cual es probablemente el reflejo de la mayor interacción con las cadenas polialdehídicas de alta reactividad que provoca distorsiones en la enzima perdiendo la configuración óptima de su centro activo. La actividad coagulante de este derivado es del 2,4%.

Los resultados parecen indicar que el la activación del soporte no ha sido adecuada para evitr los condicionantes estéricos ante la interacción específica con la caseína.

Cuando se utiliza en la inmovilización el otro soporte: *dextrano-agarosa-II* los resultados son muy diferentes según se muestra en la tabla I.13.

grado oxidación dextrano (%) (a)	grado activación soporte (b)	A.H.R. (%) (c)	A.C.R. (%) (d)
90	20	~100	25
90	70 (máxima)	~100	14,3
46	121 (máxima)	~100	2,5

(a) grado de oxidación del dextrano utilizado en el recubrimiento del soporte MANA-agarosa.

(b)  $\mu$ moles grupos reactivos (aldehído)/ml soporte.

(c) Actividad Hidrolítica Remanente: Actividad hidrolítica ensayada con respecto a la cantidad de enzima inmovilizada.

(d) Actividad Coagulante Remanente: Actividad coagulante ensayada con respecto a la actividad hidrolítica de cada derivado.

**Tabla I.13.** Derivados de renina de *Mucor miehei* preparados por inmovilización sobre los soportes dextrano-agarosa-II.

En la tabla se presentan los resultados obtenidos con tres soportes diferentes: un soporte preparado recubriendo el gel con dextrano oxidado al 46% lo cual da lugar después de la oxidación a cadenas polialdehídicas con gran cantidad de grupos aldehído reactivos, y dos soportes preparados por unión covalente de cadenas de dextrano

oxidadas casi totalmente (90%), lo que permite menor activación posterior. Estos soportes se diferencian en que uno de ellos se ha oxidado totalmente y el otro no, dando lugar a diferente densidad de grupos reactivos para la interacción con la enzima.

Los tres soportes han permitido la inmovilización de la enzima conservando su Actividad Hidrolítica independientemente de su grado de activación. Sin embargo la actividad coagulante se ve muy condicionada por el grado de oxidación final del soporte, es decir por la densidad de grupos reactivos sobre el soporte, llegando a conservar el derivado preparado sobre el soporte menos activado el 25% de su actividad caseinolítica, frente a 14,3 y 2,5% de los derivado no optimizados.

## 5. COMPARACION DE LA TRES ESTRATEGIAS. DISCUSION GENERAL

Se ha utilizado la renina de *Mucor miehei* como modelo para el estudio de la inmovilización de enzimas que actúan sobre sustratos macromoleculares, por el enorme interés que supondría la utilización en catálisis heterogénea de esta enzima a nivel industrial. El desarrollo de este estudio ha sido posible gracias a que se ha diseñado y puesto a punto un ensayo espectrofotométrico para la determinación de la actividad coagulante o caseinolítica de proteasas tipo renina. El disponer de este ensayo permite relacionar la actividad coagulante con su correspondiente actividad hidrolítica, medida con respecto a un péptido sintético que reproduce la secuencia de la caseína que la renina reconoce específicamente. Con ello se pueden valorar diferentes comportamientos de la enzima en cuanto a actividad enzimática en función del sustrato sobre el que actúa y, de este modo cuantificar el efecto de determinados procesos que pudiera sufrir la molécula de enzima y que no afectan al centro activo mismo o a la accesibilidad del sustrato sintético, pero que sí alteran la capacidad catalítica de la enzima frente al sustrato macromolecular, como por ejemplo, la inmovilización sobre un soporte cuya presencia podría suponer un importante impedimento estérico a la interacción enzima-sustrato macromolecular.

De las tres estrategias propuestas inicialmente: (i) modulación de la orientación relativa de la enzima sobre el soporte, (ii) utilización de soportes con diferente morfología interna y (iii) utilización de soportes con grupos reactivos convenientemente separados de su superficie, se han obtenido importantes resultados que se resumen a continuación.

Todos los derivados enzimáticos preparados por inmovilización covalente sobre soportes de agarosa han sido optimizados en lo que respecta a su actividad hidrolítica independientemente del soporte utilizado o de la estrategia de inmovilización, de forma que el centro activo de la enzima no se viera afectado por el proceso, y a fin de evaluar cómo afecta la inmovilización a la actividad enzimática sobre la caseína  $\kappa$ .

La modificación de la orientación relativa de las moléculas de enzima inmovilizadas con respecto al soporte ha demostrado que ésta sí influye sobre la actividad caseinolítica. Se han preparado diversos derivados de renina por inmovilización covalente a través de diferentes grupos funcionales de la enzima situados mayoritariamente en su superficie. En cada caso se ha estudiado el efecto de las variables que controlan la velocidad de inmovilización y el posible grado de unión multipuntual, de este modo se ha podido optimizar la preparación de los derivados tratando inicialmente de evitar en lo posible cualquier distorsión de la estructura de la enzima, tanto provocadas por modificaciones químicas como por la unión enzima-soporte en sí.

SOPORTE	GRUPO REACTIVO DE LA ENZIMA	A.H.R. (%) (a)		A.C.R. (%) (b)
		(c)	(d)	
glioxil-agarosa	$\epsilon$ -amino (Lys)	~100	----	2,38
MANA-agarosa	carboxilo (Asp/Glu)	~70	~100	~6,0
lutaraldehído-agarosa	amino de bajo pK	28	----	33,3 (9,6)
MANA-agarosa	cadena glicosídica oxidada	~70	~100	~15

(a) Actividad Hidrolítica Remanente: Actividad hidrolítica ensayada con respecto a la cantidad de enzima inmovilizada en cada derivado.

(b) Actividad Coagulante Remanente: Actividad coagulante ensayada con respecto su actividad hidrolítica ensayada en cada derivado.

(c) Solución de sustrato estándar.

(d) Solución de sustrato con NaCl 0,5 M.

Tabla I.14. Derivados de renina de *Mucor miehei* optimizados sobre cada uno de los diferentes soportes de agarosa.

Los resultados reflejados en la tabla I.14 muestran que la **inmovilización covalente** ha permitido la conservación de toda la actividad con respecto al sustrato sintético de pequeño peso molecular sobre tres de las cuatro estrategias de inmovilización desarrolladas. En el derivado preparado por inmovilización covalente sobre *gel glutaraldehído-agarosa*, a pesar de haber procedido, como en los otros casos, regulando las condiciones de la reacción hasta disminuir la reactividad de los grupos que intervienen en el proceso, de modo que la inmovilización tuviera lugar de forma suave, la actividad remanente ha descendido al 28% con respecto al sustrato sintético que debería mostrar menores condicionantes a la hora de la inmovilización por ser de pequeño tamaño. Los soportes activados con glutaraldehído presentan grupos de alta reactividad capaz de reaccionar a pH próximo a la neutralidad (7,0-8,6), ello permite la interacción con grupos amino de la proteína como el amino terminal (pK 7,5-8,0) y algún otro al que su posición en la molécula hubiera disminuido su pK. Este mecanismo de interacción enzima-soporte la convierte en una estrategia en la que la unión multipuntual estaría, en general, bastante impedida por el reducido número de grupos reactivos que se podrían encontrar disponibles. Como además, el control de las condiciones de la inmovilización ha sido muy estricto con el fin de bajar la reactividad para lograr una inmovilización no distorsionante, en el caso de que hubiera más de un grupo reactivo, inicialmente, en la enzima este control habría dirigido la inmovilización hacia una única unión; por ello es difícil pensar en la posibilidad de que la unión al soporte esté provocando distorsiones de la conformación activa de la enzima. La explicación a la baja actividad hidrolítica que muestra este derivado estaría en pensar que el enlace con el *soporte glutaraldehído-agarosa* ha tenido lugar por un grupo de la enzima implicado directamente en la actividad catalítica bien por pertenecer al centro activo, bien porque su modificación provoca desequilibrios en la molécula que dificultan la unión de la enzima o la propia catálisis.

En los derivados que han conservado toda su actividad catalítica frente al sustrato sintético, se podría afirmar que las moléculas no manifiestan alteraciones de su configuración activa, lo cual supondría un proceso de insolubilización pura en el cual la interacción a ha tenido lugar por el mínimo número de puntos. En el caso de los derivados inmovilizados sobre soporte activado con grupos amino, *soporte MANA-agarosa*, por tratarse de grupos ionizables que no se inactivan al finalizar la inmovilización en el medio de reacción (pH ligeramente ácido) interaccionarán iónicamente con las moléculas de enzima unidas covalentemente a él, esta interacción

es proporcional a la densidad de grupos reactivos del soporte y produce el descenso proporcional de la actividad hidrolítica. Para poder valorar la estrategia de inmovilización y determinar la pérdida de actividad que corresponde a la inmovilización covalente y la que es debida a las interacciones electrostáticas, se ha medido la actividad en un medio con alta fuerza iónica; ello permite obtener actividades mayores que, en el caso de los derivados optimizados, alcanzan el 100%, lo cual indica que **toda la caída de actividad de los derivados optimizados utilizando soporte MANA-agarosa era debida a las distorsiones provocadas por las interacciones iónicas con el soporte y no por la unión covalente al mismo.**

Los valores de actividad coagulante residual (A.C.R.) de los derivados que presentan toda su actividad catalítica frente al sustrato pequeño, representados en la misma tabla I.14, indican que aunque se haya optimizado la inmovilización de una enzima en lo que respecta a mantener intacto su centro activo, cuando la molécula de sustrato es más compleja y voluminosa existen otros factores que afectan al proceso. Estos factores dependen del grupo que haya participado en la inmovilización covalente, siendo el soporte utilizado en todos los caso el mismo: agarosa 6B-CL. Así los resultados de actividad coagulante van de un 2,38% para el *derivado glioxil-agarosa*, al 15% para el derivado obtenido por inmovilización a través de las cadenas de azúcares de la glicoproteína. La explicación podría ser que la caseína por ser una molécula voluminosa necesite la participación de alguna zona de la molécula de enzima diferente de las que participan en la unión del sustrato pequeño y que se encuentre afectada por la inmovilización; otra posibilidad sería que la presencia del soporte limite el acceso de la macromolécula de sustrato y la diferente orientación de la molécula de enzima conseguida al variar el grupo que participa en la unión covalente, dé lugar a una orientación en la cual se reduzcan los impedimentos estéricos a la entrada del sustrato por ofrecer un centro activo más accesible.

\* \* \*

La **utilización de soportes de morfología interna más abierta** y, por lo tanto, que suponen menor congruencia geométrica enzima-soporte tuvo como resultado el aumento de la actividad remanente de los derivados hasta el 25% con la orientación más desfavorecida (según los resultados, ya expuestos, obtenidos sobre agarosa). Cuando la enzima se inmovilizó a través de sus cadenas glicosiladas, orientación óptima sobre agarosa, los derivados conservan hasta el 33% de su actividad coagulante (Tabla I.15).



Esto indica que el disponer del soporte con la morfología interna más adecuada (*Eupergit* o *Biosynth*) y el utilizar la estrategia de inmovilización que permite a las moléculas de enzima la adopción de la mejor orientación (unión covalente a través de la cadenas glicosídicas oxidadas al 15% a gel MANA-agarosa), ha permitido optimizar los derivados enzimáticos de renina para la hidrólisis de su substrato natural macromolecular, caseína  $\kappa$ .

DERIVADO DE RENINA DE <i>Mucor miehei</i>	A.H.R.	A.C.R.
glioxil-agarosa	100	2,38
MANA-agarosa/Asp-Glu	100	6,0
glutaraldehido-agarosa	28	9,6
MANA-agarosa/azúcares *	100	15
glioxil-Biosynth	100	25,1
glioxil-Eupergit	100	14,5
MANA-Biosynth/azúcares *	100	28
MANA-Eupergit/azúcares *	100	33
BDE-agarosa	100	5,9
dextrano(100%)-agarosa-75	100	4,8
dextrano(90%)-agarosa-20 *	100	25

\* Derivados optimizados con cada una de las tres estrategias

Tabla I.15. Derivados de renina de *M.miehei* optimizados para cada uno de los métodos de inmovilización covalente utilizados.

\* \* \*

Con respecto a la utilización de soportes con largos grupos reactivos a los cuales se une la enzima para obtener la separación suficiente entre la enzima y la superficie del soporte, se han diseñado dos tipos de soportes con diferente tipo de "brazo espaciador".

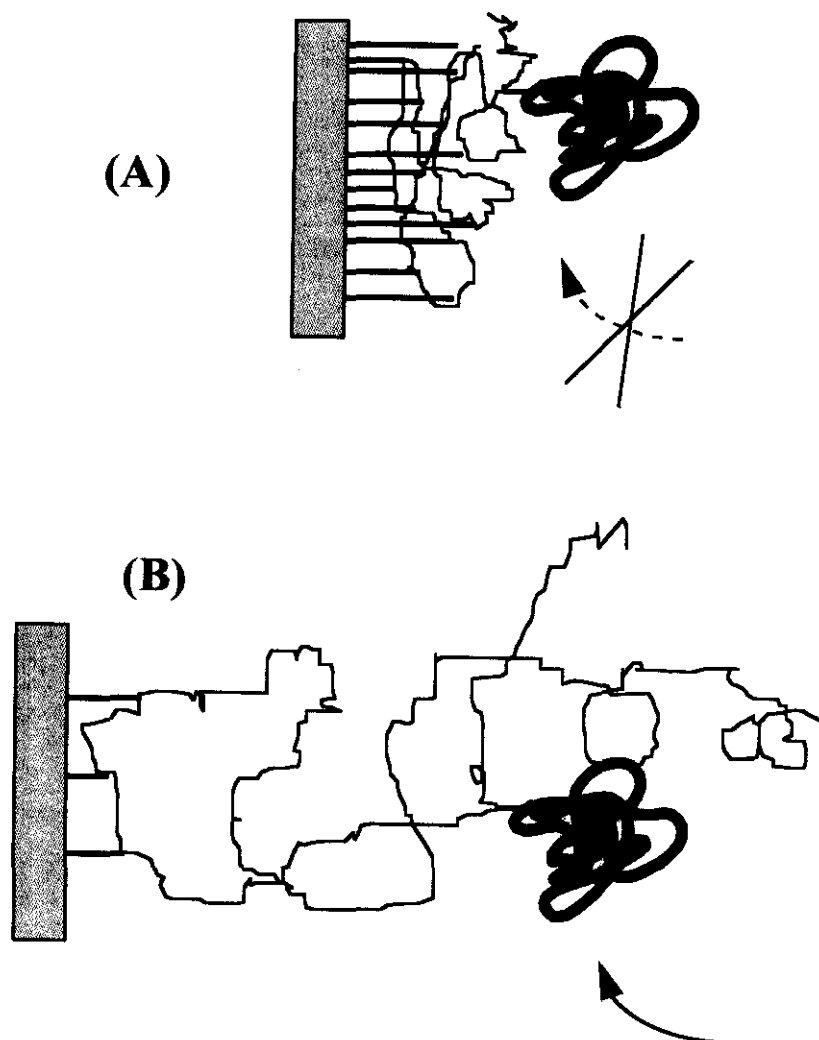
El analisis y comparación de los resultados obtenidos con cada uno de los soportes permite proponer un modelo de estructura interna tanto para los *soportes BDE-agarosa* como para los dos *soportes dextrano-agarosa*.

La cadena de 12 átomos de la molécula de 1,4-butanodiol-diclicidoxi-éter (BDE) utilizada para la activación del soporte de agarosa no parece haber sido suficiente para reducir el impedimento estérico a la interacción renina-caseína (tabla I.15).

Se han sintetizado dos tipos de soportes de agarosa 6B-CL activado con brazos espaciadores de cadena larga siguiendo procesos diferentes. Comparando los derivados obtenidos por inmovilización sobre cada uno de los soportes, se ha propuesto la posible estructura interna de estos soportes:

- El primer soporte que no ha permitido buenas actividades frente al sustrato voluminoso, ha sido preparado a partir de un soporte muy activado (75  $\mu$ moles de grupos reactivos/ml gel), por lo que es probable que entre las moléculas de dextrano (2,5  $\mu$ moles de dextrano/ml gel) y el soporte de agarosa se hayan formado varios enlaces. Ello podría haber supuesto la formación de un denso recubrimiento de la superficie de la agarosa con el polímero. A la hora de la inmovilización, cada molécula de enzima interaccionará no con largos brazos espaciadores más o menos libres, sino con una cada de dextrano de movilidad limitada a modo de segunda superficie que presenta impedimentos estéricos semejantes a los del soporte sin dextrano (figura I.16 A).

- El segundo soporte se ha preparado haciendo reaccionar sobre gel agarosa mucho menos activada (20  $\mu$ moles de grupos reactivos/ml gel) moléculas de dextrano parcialmente oxidado. Los derivados obtenidos con este soporte presentan una mayor Actividad Coagulante frente al sustrato voluminoso, es decir, estaría permitiendo un acceso más fácil de la caseína  $\kappa$  al centro catalítico, por lo que podría suponerse una disposición de las cadenas de dextrano mucho más abierta recubriendo la superficie del soporte. La unión menos intensa del dextrano a agarosa le permitiría actuar como un verdadero brazo espaciador (figura I.16 B).



**Figura I.16.** Propuesta de la disposición adoptada por las cadenas polidehídicas (dextrano oxidado) sobre el gel MANA-agarosa en cada uno de los diferentes soportes preparados: *Gel dextrano-agarosa-I* (A) y *gel dextrano-agarosa-II* (B).

La flexibilidad de las cadenas polifuncionalizadas tipo dextrano utilizadas como brazos espaciadores entre la enzima y el soporte, su longitud y su carácter hidrofílico resultó ser la más adecuada para obtener actividades coagulantes remanentes del 25% (Tabla I.15).

\* \* \*

## **CAPITULO II**

**Inmovilización-estabilización de glicoenzimas:  
Inmovilización-estabilización de la  $\beta$ -galactosidasa de  
*Aspergillus oryzae* para la hidrólisis de lactosa**

## INTRODUCCION

### 1. ESTABILIZACION DE ENZIMAS

La utilización de enzimas en química fina, medicina, tecnología de alimentos o química analítica requiere, en muchos casos, trabajar a elevadas temperaturas para incrementar la productividad y prevenir contaminaciones microbianas, la introducción de cosolventes orgánicos para desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación del producto deseado, o la incubación en medios de pH diferente de aquel al cual la enzima muestra su máxima estabilidad. La estabilidad limitada de estos biocatalizadores, su alto coste y la dificultad de regeneración condicionan sus posibilidades de aplicación y por ello gran parte de los estudios se han orientado al conocimiento de los mecanismos por los que se produce la inactivación enzimática (procesos bimoleculares y procesos unimoleculares) como base para el posterior desarrollo de sistemas enzimáticos de mayor estabilidad.

La desnaturalización de una proteína, en general, supone la pérdida de la estructura tridimensional nativa característica de su cadena polipeptídica, sin llegar a alterar la secuencia de aminoácidos. Factores como el calor, el pH, la presencia de determinados cosolutos y/o cosolventes son los desencadenantes de dichos cambios en la estructura tridimensional de la molécula, tan directamente ligada a la actividad biológica de cada proteína. El aumento de la temperatura promueve movimientos vibracionales en las moléculas en solución que conducen a su desplegamiento progresivo. La exposición de la proteína soluble a pHs extremos induce cambios en el grado de ionización de los diferentes grupos y, como consecuencia de ellos, la modificación de su posición relativa.

La distorsión de la estructura terciaria nativa de la enzima puede ser considerada como un proceso en dos etapas (4, 37) (figura II.1): La primera etapa supone cambios conformacionales sobre la molécula que conducen a un desplegamiento parcial y reversible, siempre que se elimine el agente causante de la desestabilización y se recuperen las condiciones óptimas del medio. Si, por el contrario, las condiciones

desestabilizantes se extremen o se prolongan, este primer proceso reversible favorece que sobre la enzima distorsionada tengan lugar reacciones posteriores de diferente naturaleza tan intensas que hacen imposible la recuperación de la disposición relativa inicial de sus grupos cuando se retorna al medio óptimo, es decir la molécula de enzima se inactiva irreversiblemente. El resultado final sería una conformación inactiva de la enzima, la pérdida de su estructura cuaternaria, procesos de agregación intermolecular, disociación de cofactores, modificación química de grupos inicialmente menos expuestos al medio, etc. Por esta razón, una estrategia general de estabilización para proteínas (o enzimas) deberá estar basada en la inhibición de la primera etapa del proceso de inactivación, es decir en tratar de disminuir la posibilidad del primer desplegamiento de la estructura proteica, pues un sistema que confiera rigidez a la molécula dificultará los primeros cambios conformacionales reversibles impidiendo procesos posteriores más graves (5).

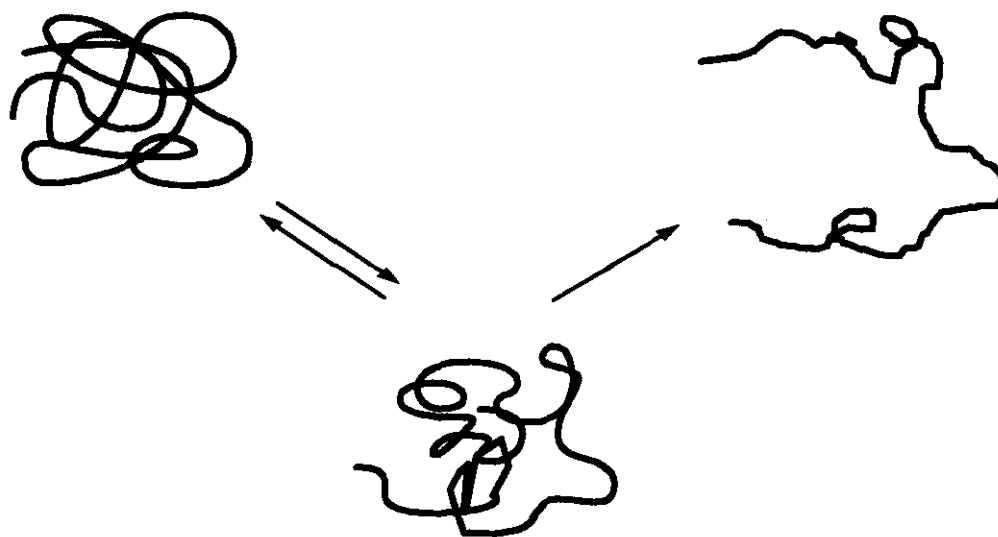


Figura II.1. Desnaturalización-renaturalización de una proteína globular.

La presencia de determinados compuestos en una solución enzimática ejerce un pronunciado efecto estabilizante. Entre los **aditivos** utilizados para estabilizar enzimas en solución se encuentran azúcares, alcoholes polihidroxílicos como glicerol o etilenglicol, determinados cosolventes orgánicos, sustancias detergentes, polímeros y sales. El efecto estabilizante ejercido por los azúcares (sacarosa, lactosa, etc) o por alcoholes polihidroxílicos parece ser el resultado de la interacción preferencial de las proteínas con

el medio acuoso en presencia de estos aditivos (38).

También la **modificación química** de proteínas ha permitido modificar las propiedades de las enzimas, permitiendo alterar su solubilidad, su actividad e incluso su estabilidad. En este sentido se han conseguido modificaciones controladas de la superficie de la enzima que provocan cambios en la interacción entre ésta y el medio, favoreciendo el mantenimiento de su conformación activa. Cuando la modificación química de la molécula tiene lugar con un reactivo bifuncional o polifuncional (39, 40) la formación de puentes o **entrecruzamientos** (covalentes, iónicos, etc.), en muchos casos, evita el desplegamiento de la macromolécula haciéndola más estable.

Todas aquellas estrategias de **inmovilización** que implican el aislamiento o dispersión de cada molécula de enzima, aunque no disminuyan la inactivación debida a los procesos unimoleculares que afectan a la estructura 3D de la enzima, suponen cierta estabilización ya que evitan los contactos intermoleculares que podría dar lugar a fenómenos de agregación o autólisis, en el caso de proteasas, pero fue Klivanov (3) en 1983 el que propuso que, cuando la inmovilización de un enzima tiene lugar por interacción con una determinada matriz o soporte a través de varios puntos, ésta debería ejercer un importante efecto estabilizador. Mozhaev *et al.* (4, 5) y Martinek *et al.* (6) desarrollaron con éxito esta propuesta de estabilización utilizando como estrategia de inmovilización la copolimerización. Muchas de las estabilizaciones logradas por entrecruzamiento se basan en el mismo concepto: el aumento de la rigidificación de la estructura tridimensional de la enzima (39). Desde el punto de vista biotecnológico la **inmovilización multipuntual** como estrategia de estabilización presenta un enorme interés pues permite resolver mediante una única técnica los dos problemas principales que limitan la aplicación de biocatalizadores a nivel industrial: la reutilización y/o posible uso en continuo, y la estabilización.

En principio la copolimerización es el método con el que más fácilmente podría lograrse un alto grado de multiinteracción, debido a la gran congruencia geométrica entre la enzima y la matriz polimérica, sin embargo las matrices presentan gran sensibilidad al medio lo cual afecta directamente a las moléculas de enzima integradas en ella. Además el proceso de polimerización no permite, en general, el control del grado de interacción de la enzima y la estructura cerrada del copolímero plantea grandes problemas para la difusión de sustratos y productos. En este sentido, la inmovilización covalente multipuntual de enzimas a soportes sólidos preexistentes supondría superar

estas limitaciones, permitiendo, además, la elección tanto del soporte adecuado como del tipo de grupos reactivos, así como el control de las condiciones del proceso, con la finalidad de conseguir en cada caso el soporte con la adecuada congruencia geométrica que permita la multiinteracción suficiente para frenar los posibles cambios conformacionales de la enzima unida a él, afectando lo menos posible a su actividad para su posterior y rentable aplicación a gran escala.

La estrategia de inmovilización y estabilización por unión covalente multipuntual desarrollada por Guisán *et al.* (7-12), gracias principalmente a las características de los grupos reactivos del soporte y a la reversibilidad de cada enlace entre éstos y los grupo reactivos de la molécula de enzima, que se han descrito ampliamente en la Introducción General del presente trabajo, ha permitido un amplio estudio de todas las variables que intervienen en el proceso de inmovilización (7, 8). Los resultados obtenidos de su aplicación sobre numerosas enzimas reflejan que se trata de una adecuada estrategia de inmovilización y estabilización de proteínas en general.

## 2. INMOVILIZACION-ESTABILIZACION DE GLICOPROTEINAS

A nivel biológico la presencia de las cadenas de azúcares en las moléculas de las glicoproteínas son imprescindibles por las características de hidrofiliidad, movilidad en los tejidos o capacidad de unión a determinadas zonas de la célula que confieren a la proteína de la que forman parte.

Los estudios realizados *in vitro* sobre glicoenzimas han demostrado que los carbohidratos confieren a la glicoenzima resistencia frente a la acción de proteasas y, en muchos casos estabilidad térmica (41-43), siendo raros los casos en los que se haya probado que la actividad enzimática dependa de la presencia de los residuos glicosilo (44, 45).

El importante efecto estabilizador de la fracción glicosídica se ha relacionado con el aumento de hidrofiliidad que supone su presencia en el entorno de la molécula y con el establecimiento de interacciones no covalentes con la superficie proteica que mantienen su conformación activa. Según Mozhaev *et al.* (46) la aproximación más sencilla y fiable para la estabilización artificial de una proteína sería la hidrofiliización de la zona no polar de su superficie. En este sentido, la neo-glicosilación o introducción de nuevos residuos azucarados sobre los grupos no-polares o sobre grupos próximos a zonas



no-polares de la enzima supone un importante incremento de su estabilidad (47).

La utilización de estrategias generales de inmovilización o estabilización de enzimas cuando se trata de moléculas glicosiladas plantea importantes problemas debido a que la presencia de cadenas glicosídicas en la superficie de la proteína puede dificultar la interacción de los residuos de la estructura proteica (*amino terminal, Lys, Asp /Glu, etc.*) con los grupos activos del soporte al cual se quiera inmovilizar la enzima. En consecuencia se han diseñado procesos en los cuales es la fracción glicosídica la que participa en la reacción (48-50) lo cual, además de evitar los problemas de accesibilidad, presenta ventajas adicionales pues al participar en la reacción grupos muy alejados del centro activo la posibilidad de que el proceso afecte a la actividad enzimática es mínima.

Aunque la justificación para el desarrollo de estas estrategias es correcta desde el punto de vista de la inmovilización, cuando se busca además la estabilización de la enzima por inmovilización multipuntual, surge una limitación importante pues la fijación al soporte por estos puntos tan distantes e independientes de la zona proteica apenas supondrá rigidificación adicional de la estructura espacial de la molécula, y por consiguiente la ganancia en estabilidad de la estructura terciaria será nula.

## **2.1. PROPUESTA DE ESTABILIZACION DE ENZIMAS GLICOSILADAS**

A continuación se describen las estrategias originales de inmovilización-estabilización de enzimas glicosiladas desarrolladas en el presente capítulo, así como los estudios de estabilidad realizados.

La propuesta desarrollada en este capítulo consiste en la utilización de dos herramientas para el abordaje de la inmovilización-estabilización de glicoenzimas: En primer lugar, el enriquecimiento de la superficie de la enzima en grupos reactivos con el fin de que la inmovilización covalente al soporte tenga lugar a través de mayor número de puntos. De este modo se pretende compensar el impedimento estérico que supone la presencia de las cadenas glicosídicas a la inmovilización multipuntual de la enzima, insistiendo en la rigidificación de la estructura 3D como método óptimo para la estabilización. En segundo lugar y una vez inmovilizada la enzima se aprovechará la presencia de las cadenas de los carbohidratos como agentes entrecruzantes intrínsecos en busca de estabilizaciones adicionales.

Las etapas seguidas en el proceso serán:

***a.- Inmovilización no distorsionante a través de enlaces muy estables.***

Se estudiará la inmovilización de la enzima nativa sobre geles glioxil-agarosa. Utilizando esta estrategia de inmovilización se han conseguido estabilizaciones muy importantes de enzimas no glicosiladas a consecuencia de la fuerte unión multipuntual enzima-soporte (8-12).

***b.- Enriquecimiento de la superficie enzimática en grupos amino.***

Dado que la presencia de las cadenas glicosídicas puede reducir el area disponible para la interacción con el soporte, se intentará aumentar la capacidad de la enzima para realizar uniones multipuntuales. Para ello se relizarán modificaciones controladas de los grupos carboxilo de la enzima con etilendiamina (vía activación con carbodiimida). De este modo se espera que la densidad de grupos amino capaces de participar en un proceso de inmovilización de tipo multipuntual sea más elevada que al utilizar la enzima nativa.

Evidentemente este tipo de procesos requieren un estricto control tanto de la modificación química en sí como de la inmovilización posterior. La optimización del proceso ha de suponer un compromiso entre una modificación química que altere lo menos posible las propiedades de la enzima soluble pero suficiente para permitir la estabilización adicional consecuencia de la inmovilización.

***c.- Entrecruzamiento intramolecular de la enzima nativa y de la enzima enriquecida en grupos amino utilizando las propias cadenas glicosídicas como agente entrecruzante.***

La oxidación de las cadenas glicosídicas con peryodato genera la formación de grupos aldehído, los cuales pueden reaccionar con grupos amino de la misma glicoproteína produciéndose entrecruzamientos intramoleculares. De este modo se habrá reducido la movilidad de los residuos implicados, con lo cual las posibilidades de cambios conformacionales en la molécula serán menores, pudiendo verse reducida la subsiguiente inactivación.

Es interesante señalar que este tipo de estrategias son adecuadas para ser desarrolladas sobre proteínas en fase sólida, es decir despues de haber sido

insolubilizadas, de otro modo la oxidación, que en sí supone la activación del agente entrecruzante intrínseco, podría producir reacciones intermoleculares entre los azúcares de una molécula y los grupos amino de otra diferente. Al estar la moléculas independientes y enlazadas al soporte se puede diseñar un proceso de entrecruzamiento exclusivamente intramolecular.

Ya que el enriquecimiento en grupos amino de la superficie de la enzima descrito en el apartado b, puede afectar tanto a la inmovilización multipuntual como al entrecruzamiento intramolecular se estudiará el proceso global para obtener el mejor binomio de actividad y estabilidad.

*d.- Estudios de estabilidad de los derivados inmovilizados-estabilizados.*

Tanto la unión covalente multipuntual a soportes activados como el entrecruzamiento intramolecular deben producir el mismo tipo de mecanismo de estabilización: la fijación de las distancias entre diferentes residuos de la superficie proteica y el consiguiente aumento de la rigidez de la enzima. Por ello los efectos estabilizantes de dichas estrategias deberían observarse en cualquier tipo de experimento de inactivación. Sin embargo, al encontrarse los procesos asociados a modificaciones químicas de la enzima, ello puede suponer un efecto muy diferente sobre la estabilidad de la enzima en función de las condiciones experimentales bajo las que se encuentre. Para comprender los mecanismos globales de inactivación y para evaluar la estabilización conseguida se han realizado estudios en diferentes medios de incubación.

### **3. $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Aspergillus oryzae***

La  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -galactosido galactohidrolasa, EC 3.2.1.23) producida por el hongo *Aspergillus oryzae* es una glicoproteína extracelular monomérica con un peso molecular de 105.000 D. Con respecto a su composición en aminoácidos, posee un alto contenido en Asp y Glu, 10,5 y 9,1 %, respectivamente y un 4,4% en Lys (51-52). Estas cadenas de carbohidratos corresponden a oligosacáridos de tipo galactomanosa que se dividen en dos fracciones atendiendo a su longitud: el 4% corresponde a cadenas largas y el 96% restante está constituido por cadenas cortas. La fracción azucarada total de la glicoproteína supone un 11% del peso de la molécula y las cadenas se unen a la estructura proteica a través de residuos de N-acetil-glucosamina (53). El elevado

contenido en azúcares de esta glicoenzima de confiere gran estabilidad en medios ácidos.

Su pH óptimo de actividad es 4,5 cuando su actividad se mide empleando el sustrato sintético, oNPG<sup>1</sup>, y 4,8 para lactosa, sustrato natural. La temperatura óptima se sitúa entorno a los 45-50°C para el primero y a una temperatura algo menor (30°C) para el sustrato natural (54). Los parámetros cinéticos de la enzima varían en función del sustrato sobre el que actúe, así se han determinado un valor de  $K_M$  para lactosa de 50 mM y de 0,7 mM para oNPG y una  $V_{max}$  de 2,4 y 55,6  $\mu\text{g}/\text{min}.\text{mg}$  de proteína para lactosa y oNPG, respectivamente.

La presencia de glucosa (20-400 mM) o manosa en el medio de reacción no afecta a la actividad enzimática, pero sí la de galactosa que actúa como inhibidor competitivo, aunque también se ha reportado inhibición no-competitiva producida por el mismo monosácarido (55).

La presencia de NaCl o KCl iones en el medio de reacción reduce la actividad enzimática en mayor medida cuanto más básico es el medio (56). La hidrólisis de oNPG es fuertemente inhibida por cationes divalentes como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Ag}^{2+}$ .

Se ha logrado la inmovilización de esta enzima por métodos muy variados. A través de su fracción proteica: por unión covalente a matrices solubles de poliacroleína, si bien los derivados conservan buenos valores de actividad enzimática, la estabilización conseguida es mínima (57); por reacción con alginatos hidrosolubles activados con carbodiimida consiguiéndose bajos rendimientos en la unión covalente e importantes pérdidas de actividad, sin haberse estudiado la estabilidad (58); por unión covalente a soporte de magnetita activada convenientemente con grupos aldehído, obteniéndose derivados enzimáticos muy estables, aunque con baja actividad remanente (59) o por reacción con un soporte poroso de  $\text{SiO}_2$  silanizado y tratado con glutaraldehído (60). Se ha llegado incluso a diseñar diferentes reactores para la hidrólisis de lactosa: reactores de tipo de membrana enrollada, de lecho poroso (basados en la inmovilización de la enzima sobre partículas de sílice atrapadas en una lámina estriada microporosa de polivinilo (61, 62) o de lecho fijo (63).

---

<sup>1</sup>o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido, introducido por Aizawa como sustrato cromogénico para galactosidasas.  
Aizawa, K. 1939. *Enzymologie* 6, 321.

Ensayo: Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Vol 3, pg 16.66 (1989).

## OBJETIVOS

En este capítulo se estudiará la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, como enzima de interés industrial y al mismo tiempo, como modelo para el desarrollo de diferentes estrategias de estabilización de enzimas glicosiladas asociadas al proceso de inmovilización, es decir, aplicadas durante y después del proceso de inmovilización de la enzima.

Se abordarán fundamentalmente tres estrategias de estabilización:

- a.- La unión covalente multipuntual de la enzima nativa a soportes glioxil-agarosa.
- b.- El enriquecimiento de la enzima en grupos amino para optimizar su unión covalente multipuntual sobre los geles de agarosa.
- c.- La utilización de la propias cadenas glicosiladas de la enzima inmovilizadas para promover entrecruzamientos intramoleculares entre dichas cadenas y los residuos amino de la estructura proteica.

Además se evaluará el efecto conjunto de las tres estrategias incluyéndose la modificación química con etilendiamina de los residuos carboxílicos de la proteína por reacción con carbodiimida, la unión covalente multipuntual de la enzima modificada sobre el soporte, la oxidación parcial de las cadenas glicosídicas de la enzima inmovilizada; y la reacción intramolecular de entre estas cadenas de azúcares activadas por oxidación y la fracción proteica de la propia molécula de enzima inmovilizada multipuntualmente.

Dado que la mayoría de las estrategias están basadas en modificaciones químicas previas de la enzima (aminación de los grupos carboxilo, oxidación de los azúcares) será necesario un control muy riguroso de todas las reacciones, teniendo en cuenta el efecto conjunto que sobre la actividad y estabilidad finales del derivado enzimático puede tener cada proceso.

Para finalizar se estudiarán las cinéticas de inactivación de los derivados en diferentes condiciones experimentales para una mejor evaluación del efecto combinado de modificaciones químicas y estrategias estabilizantes.

\* \* \*

## METODOS:

### 1. ACTIVACION DEL SOPORTE DE AGAROSA

En este Capítulo se han empleado dos soportes: el soporte glioxil-agarosa y el soporte MANA-agarosa. La descripción de los Métodos de activación se ha realizado en el Capítulo I (Métodos, Apartado 1.1.1).

### 2. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Aspergillus oryzae*

El ensayo utilizado ha sido el siguiente: A una cubeta con 2 ml de solución de sustrato 10 mM en tampón acetato 0,1 M a pH 4,5 termostatizada a 25°C y con agitación suave, se le añade una muestra de 25-200  $\mu$ l de solución enzimática o de suspensión de derivado. Del registro del incremento de absorbancia que se produce a 420 nm en función del tiempo transcurrido, se determina la velocidad inicial de hidrólisis para este sustrato la cual se dará en *Unidades de Actividad*. Se define la *Unidad de Actividad* como la cantidad de enzima que es capaz de hidrolizar 1  $\mu$ mol de oNPG por minuto a 25°C.

### 3. SEMIPURIFICACION DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Aspergillus oryzae*

Se disuelve extracto comercial de  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* en una concentración de 2,5 mg/ml en tampón acetato 15 mM de pH 5,0 agua, por centrifugación se separa la fracción no soluble. Al sobrenadante se le añade gel MANA-agarosa de 75  $\mu$ moles/ml gel resultando una suspensión 1:170 que se mantiene con agitación suave, a pH 5,0 y temperatura ambiente durante 2,5 horas. La adsorción iónica de la enzima sobre el soporte se aprecia al disminuir la actividad enzimática del sobrenadante.

Se filtra y se lava el gel con tampón acetato 15 mM de pH 5,0 abundante para eliminar todo lo que no se haya adsorbido. Se resuspende en tampón fosfato 20 mM, NaCl 0,1 M de pH 7,0, frío y se mantiene la suspensión 1:6, a unos 4°C, el tiempo necesario para que se desorba la máxima cantidad de enzima. Se filtra, recogiendo el sobrenadante para dializarlo frente a tampón acetato 15 mM de pH 5,0 en la cámara fría.

La solución enzimática semipurificada se conserva en la cámara fría durante varios días.

#### 4. MODIFICACION QUIMICA DE LA ENZIMA NATIVA CON ETILENDIAMINA (1,2-diaminoetano)

Los grupos carboxilo de la enzima se modifican con *etilendiamina* (EDA) siguiendo el método desarrollado por Hoare *et al.* (64).

Un volumen de solución enzimática semipurificada y dializada de aproximadamente 300 U.A.H./ml se diluye a la mitad con una solución de EDA 2M a pH 4,75. Una vez comprobado que el pH se mantiene, se agrega *carbodiimida* (CDI) de forma que su concentración final sea  $1 \cdot 10^{-2}$  M y se incuba con agitación suave a 20°C durante 1,5 horas. Transcurrido este tiempo se procede a dializar frente a una solución tampón de acetato 15 mM al mismo pH de 5 litros realizando 5 cambios para favorecer la rápida eliminación de los reactivos del medio, y en cámara fría para disminuir las posibilidades de reacción entre los grupos hasta que la eliminación de reactivos del medio sea total.

Por otra parte, también se realizan otras modificaciones químicas más moderadas, suavizando las condiciones de reacción, tanto subiendo el pH a 6,0, como disminuyendo la concentración de CDI hasta  $1 \cdot 10^{-3}$  M. Con ello se pretende disminuir el grado de activación de los carboxilos y, por tanto, la reactividad de estos grupos hacia la EDA.

A los tres tipos de modificación química logrados se les ha denominado: *modificación 5.2, 5.3 y 6.2*, en alusión a los dos parámetros que se varían: pH de reacción (4,75 ó 6,0) y concentración de CDI ( $1 \cdot 10^{-2}$  ó  $1 \cdot 10^{-3}$  M).



## 5. PREPARACION DE DERIVADOS DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Aspergillus oryzae*

Se han preparado derivados enzimáticos por inmovilización a soportes de agarosa, tanto de la enzima nativa como de la enzima modificada previamente con EDA.

En un determinado volumen de solución enzimática semipurificada, concentrada y dializada (*Apartado 3*), con una actividad aproximada de 300 U.A.H./ml se disuelve *galactosa* al 20%, enfriando hasta 4°C. La solución resultante se diluye a la mitad con tampón bicarbonato 40 mM de pH 9,5, también enfriado previamente, e inmediatamente se suspende en ella el *gel glioxil-agarosa* en relación 1:2. Se ajusta el pH a 10,2 y la temperatura a 15°C. Después de 3 horas de incubación de la suspensión de reacción en estas condiciones con agitación suave, se procede a la reducción con  $\text{NaBH}_4$  (1mg/ml) a 15°C durante 45 minutos, no sin antes haber diluido la suspensión hasta 1:10 (v:v) con el mismo tampón. Posteriormente se filtra, lavándose abundantemente con tampón fosfato 25 mM de pH 7.0 y con agua.

Esta descripción del método de preparación del derivado es la que corresponde al derivado de la enzima nativa considerado como optimizado después de haber modificado parámetros como el pH (10,0, 10,2 y 11,3), la temperatura (4, 15 y 20°C) y el tiempo (entre 30 minutos y 20 horas) para la interacción enzima-soporte.

Para la preparación de los derivados de la enzima previamente modificada con EDA el método seguido es semejante. Para ofrecer mayor cantidad de enzima al soporte, la suspensión de reacción se prepara en relación 1:5 y se incuba a pH 9,0 a 20°C durante 2,5 horas inmovilizándose prácticamente el total de la enzima ofrecida. A continuación se sube el pH de la mezcla de incubación a 10,0, manteniéndose 72 hora más a la misma temperatura y pH, siempre con agitación suave. La reducción en este caso se realiza una vez diluida la suspensión hasta 1:10 con el mismo tampón de pH 10,0.

## 6. MODIFICACION QUIMICA CON $\text{NaIO}_4$ DE LOS DERIVADOS ENZIMATICOS

Se han modificado químicamente con  $\text{NaIO}_4$  los derivados enzimáticos tanto de la enzima nativa, como de la enzima modificada previamente con EDA.

Se trata una suspensión 1:10 en agua del derivado optimizado de  $\beta$ -galactosidasa nativa sobre *gel glioxil-agarosa-75* (*Métodos 5.1*) con  $\text{NaIO}_4$  a temperatura ambiente,

ofreciendo  $3 \cdot 10^{-2}$   $\mu$ moles por U.A.H. (4,5 U.A.H./mg extracto comercial ó 25 U.A.H./mg proteína semipurificada) que correspondería a 3,86  $\mu$ moles/ml derivado. Se mantiene la incubación a temperatura ambiente y con agitación constante hasta alcanzar al consumo máximo de  $\text{NaIO}_4$ , lavando a continuación con agua abundante.

Para modificaciones moderadas (25 ó 50%) de este derivado se trata con  $0,75 \cdot 10^{-2}$  ó  $1,5 \cdot 10^{-2}$   $\mu$ moles  $\text{NaIO}_4$ /U.A.H., respectivamente.

Para la oxidación con peryodato de los derivados de la enzima modificada previamente con EDA se realiza siguiendo el mismo método. Independientemente de la actividad final de los derivados preparados con enzima modificada con EDA y por haber sido idénticos los rendimientos de la inmovilización, se trata una suspensión 1:10 de derivado en agua con 3,86  $\mu$ moles de  $\text{NaIO}_4$ /ml derivado, incubando hasta el consumo máximo del agente oxidante.

## 7. ENTRECruzAMIENTO INTRAMOLECULAR

La estrategia desarrollada consiste en el aprovechamiento de las cadenas glicosídicas de la glicoenzima como agente entrecruzante intrínseco. El proceso consiste en la reacción de los grupos aldehído producidos por oxidación de las cadenas glicosídicas y los grupos amino superficiales de su fracción proteica. La reacción se lleva a cabo sobre los derivados de enzima inmovilizada.

Se suspende el derivado glioxil-agarosa de  $\beta$ -galactosidasa (modificada o no con EDA) oxidado con  $\text{NaIO}_4$  en tampón fosfato sódico de pH 7,0 en el que previamente se había disuelto TMAB 150 mM. La mezcla de reacción se mantiene a pH 7,0, con agitación suave y a temperatura ambiente durante tiempo variable. Cuando la incubación se prolonga durante días, cada 48 horas se filtra el derivado y, sin lavarlo, se resuspende en una nueva solución de incubación en idéntica relación. Transcurrido el tiempo deseado, se diluye la suspensión con tampón bicarbonato 40 mM, galactosa 20% de pH 9,0 a 4°C, agregando 1 mg/ml de  $\text{NaBH}_4$ . La suspensión se agita suavemente y después de una hora se filtra y se lava abundantemente con tampón fosfato de pH 7,0 y con agua.

## 8. ENSAYOS DE ESTABILIDAD ENZIMATICA

Se realizan incubaciones de los diferentes derivados obtenidos en medios tamponados de acetato 20 mM a pH 4,5 y 50°C, de fosfato 20 mM a pH 7,0 y 50°C y de bicarbonato 20 mM a pH 9,0 y 25°C. Cada cierto tiempo se extraen de cada suspensión enzimática alícuotas de 20-200  $\mu$ l para el ensayo de sus respectivas actividades remanentes. Se representan los porcentajes de estas actividades puntuales respecto a las iniciales en función del tiempo. De este modo se pueden comparar estabilidades de diferentes derivados, o del mismo en diversas condiciones de incubación, así como determinar las semividas de la enzima en dichas condiciones.

\* \* \*

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. SEMIPURIFICACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO COMERCIAL

Con el fin de eliminar de la solución de extracto enzimático comercial, otros productos diferentes de la propia  $\beta$ -galactosidasa como estabilizantes restos de tratamientos previos o del cultivo celular original, que podrían interferir en el proceso de inmovilización de la enzima, se ha considerado conveniente la semipurificación de la solución de la solución del extracto comercial de  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae*.

Según experimentos previos realizados en el laboratorio (65), el trabajar con la solución enzimática previamente semipurificada afecta al proceso de inmovilización covalente sobre soporte glioxil-agarosa en dos sentidos: acelerando la velocidad de insolubilización y favoreciendo la pérdida de actividad enzimática residual del derivado obtenido. La explicación a este comportamiento podría encontrarse en que al eliminar del medio ciertas impurezas del extracto crudo se evita su interferencia en el proceso de inmovilización de la enzima, y por ello la insolubilización se favorece y la unión al soporte es más intensa, provocando mayores pérdidas de actividad.

El método seguido para la semipurificación consiste en la *adsorción-desorción diferencial a geles MANA-agarosa*. Durante la incubación de la solución enzimática a pH 5,0 en presencia del soporte tiene lugar la adsorción iónica de la proteína, a través de sus grupos carboxilo al soporte activado con grupos amino. El posterior lavado con el mismo tampón de pH 5,0 permite la eliminación de todo aquello que no se encuentre ionizado. Resuspendiendo el soporte bien lavado en el medio adecuado se favorece la desorción de la enzima, obteniéndose la solución enzimática semipurificada. El método que se ha seguido para la semipurificación de la solución enzimática ha sido modificado con respecto al utilizado por Santana (65). La modificación introducida afecta a la etapa de desorción y supone, en primer lugar, la substitución del medio de pH 10,0 en el que se resuspende el gel, por una solución tampón de pH 7,0 y con alta fuerza iónica capaz de romper las interacciones iónicas establecidas entre la enzima y el soporte, de este modo se evita exponer a la enzima a un medio básico desestabilizante para la  $\beta$ -

galactosidasa de *A. oryzae*, y segundo, la suspensión del gel en un volumen de tampón menor que el de la suspensión de adsorción, de forma que la desorción de toda la proteína del soporte suponga la obtención de una solución enzimática concentrada.

La incubación a pH 5,0 de la solución de extracto enzimático comercial (4,5 U/mg extracto) en presencia del gel *MANA-agarosa* ha permitido la adsorción del 93-98% de la enzima en 1 hora a temperatura ambiente. Una vez lavado el gel y eliminado, por lo tanto, todo aquello que no se hubiera adsorbido, al resuspender el soporte en tampón de pH 7,0 y con alta fuerza iónica (NaCl 0,1 M) se logró la desorción del 82-89% de la enzima en 3-5 horas.

El proceso de semipurificación llevado a cabo no afecta a la estabilidad de la enzima, siendo idéntica para la solución del extracto enzimático crudo y para la semipurificada: mantienen el 100% de su actividad durante 5 días incubada a 4°C y pH 7,0, y muestra un valor de semivida de 1,5-2 horas a 55°C y pH 7,0.

## **2. INMOVILIZACION DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *A. oryzae* POR UNION COVALENTE SOBRE SOPORTE GLIOXIL-AGAROSA**

El objetivo de la inmovilización covalente de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* al soporte glioxil-agarosa no sólo es lograr que ésta se insolubilice, sino que se formen entre ambos enlaces capaces de ayudar al mantenimiento de la estructura tridimensional de la enzima por conferirle mayor rigidez que cuando la molécula se encuentra libre en el medio. La inmovilización de la molécula al soporte a través de cadenas o grupos reactivos de pequeño tamaño y numerosos, hace que se mantenga fija la posición relativa entre estos puntos, confiriendo resistencia al conjunto y limitando las posibilidades de deformaciones y desplegamientos provocados por las condiciones del medio.

Se han tomado como punto de partida experimentos previos realizados en el laboratorio (65). En la tabla II.1 se recogen dos de los derivados enzimáticos que se han obtenido, mostrándose el efecto de la duración de la interacción y de la temperatura a la que tuvo lugar dicho proceso, sobre la actividad enzimática remanente que conservó la enzima inmovilizada covalentemente. Cuando la interacción tuvo lugar a 20°C durante 2 horas el derivado mostró una actividad remanente del 70 % (derivado A.1), mientras cuando el proceso de interacción se alargó hasta 19 horas y se elevó la temperatura hasta los 25°C la actividad remanente descendió al 20% (derivado A.3). El derivado A.3 fue

el único que mostró una ligera estabilización, sin llegar a duplicar la semivida de la enzima en solución.

derivado	pH <sub>inmov</sub>	t <sub>inmov</sub> / T <sub>inmov</sub> <sup>a</sup>	Act.rem.(*)
A.1	10,0	2h/20°C	70
A.3	10,0	5h/20°C y 17h/25°C	20
A.3 <sub>optimizado</sub>	10,2	3h/15°C	75

(\*) Porcentage de actividad enzimática remanente en cada derivado preparado según la condiciones experimentales indicadas

**Tabla II.1.** Derivado de  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* optimizado en relación a los derivados preparados con anterioridad.

Basándose en estos resultados, se procedió a optimizar los derivados enzimáticos, buscando aumentar la reactividad enzima-soporte mediante modificaciones de las condiciones de inmovilización (pH, temperatura, tiempo de interacción, cantidad de enzima ofrecida) que favorezcan la multiinteracción. Se prepararon diferentes derivados (resultados no mostrados), de los cuales el de mayor estabilidad no superaba el mejor valor de semivida logrado con el derivado denominado A.3. Para su preparación se alcalinizó ligeramente el pH hasta 10,15-10,2 para aumentar la reactividad de los grupos amino superficiales de la enzima que reaccionan con el soporte, bajándose la temperatura hasta 15°C para evitar la inactivación de la enzima. Este derivado se denominó A.3<sub>optimizado</sub> por presentar la misma ganancia de estabilidad que el derivado A.3, a costa de una menor pérdida de actividad enzimática (25%), lo cual indica la menor distorsión por unión al soporte.

En todos los casos la inmovilización ha tenido lugar en presencia de *galactosa*. La *galactosa*, como inhibidor competitivo, protege al centro activo, favoreciendo su conformación espacial óptima, evitando por tanto que ni las condiciones del medio, ni la interacción con el soporte puedan distorsionarlo. Concretamente, para la inmovilización de esta  $\beta$ -galactosidasa su presencia es imprescindible para el mantenimiento de la estabilidad de la enzima a pH 10,0-10,2 durante el tiempo que dura la inmovilización hasta la reducción de los enlaces formados.

Con respecto al estudio del proceso de inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* sobre soporte glioxil-agarosa se puede señalar que el control de las condiciones de inmovilización permite modificar la actividad remanente del derivado resultante. Cuando la inmovilización provoca caídas importantes de la actividad enzimática, pese a esta gran inactivación consecuencia de la interacción más intensa con el soporte, los derivados obtenidos no muestran estabilizaciones equitativas (Figura II.2). La interacción intensa con el soporte no permite una multiinteracción capaz de conferir una rigidificación de la estructura 3D tal que la enzima se vea estabilizada.

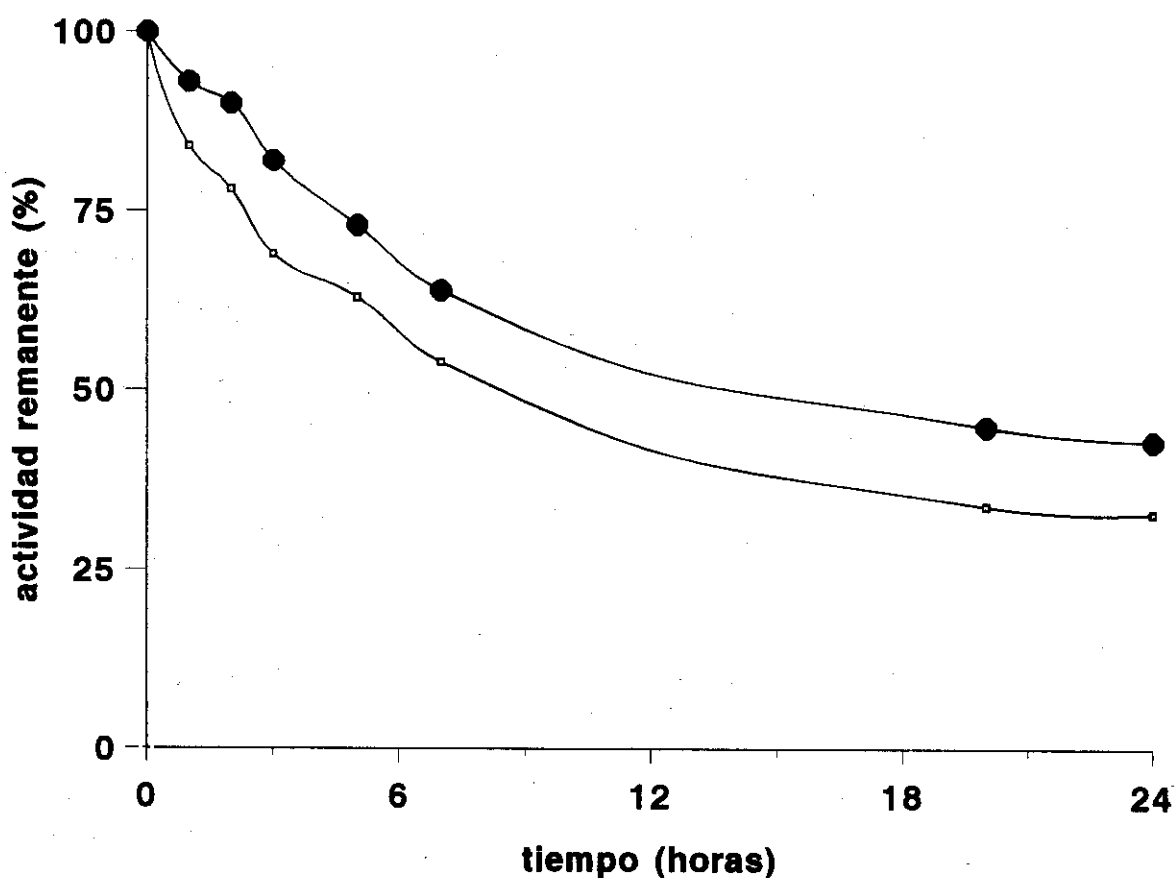


Figura II.2. Estabilidad térmica de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* nativa (■) y de un derivado de ésta inmovilizada covalentemente sobre el soporte glioxil-agarosa (●)

Todo ello manifiesta de forma clara que la inmovilización de la enzima a través de sus grupos amino no ha permitido el número de enlaces suficiente para proporcionar a la molécula rigidez de su estructura terciaria. El número de residuos de *Lys* es de 34-39

por molécula (51, 52), relativamente alto, si se compara este número con los 14 residuos Lys que posee tripsina (40.000 D), los cuales han permitido establecer interacción máxima a través de 7 residuos, confiriendo una estabilización de 5.000 veces con respecto a la enzima soluble en ausencia de autólisis (8). La explicación de este diferente comportamiento de la  $\beta$ -galactosidasa podría encontrarse en que se trata de una glicoenzima: la presencia de las cadenas de oligosacáridos plantearía un importante impedimento estérico a la interacción entre los grupos enzimáticos de la superficie de la fracción proteica con los grupos glioxilo del soporte, por lo que las posibilidades de interacción multipuntual, y en consecuencia de estabilización, serían bajas. Otro factor a tener en cuenta es que, de los 39 residuos de Lys solamente 12 aminos primarios se encuentran en la superficie de la molécula (66), lo cual unido a la presencia de los azúcares y al gran volumen de la molécula (90.000 D) reduce considerablemente la posibilidad de formación de varios enlaces y de que estos confieran estabilidad a una molécula tan voluminosa.

### 3. ENRIQUECIMIENTO DE LA GLICOPROTEINA EN GRUPOS REACTIVOS SUPERFICIALES

Dado que la inmovilización de la enzima nativa sobre gel *glioxil-agarosa-75* no ha permitido la estabilización de la estructura tridimensional, ni siquiera forzando las condiciones para lograr mayor grado de unión covalente, se ha estudiado la posibilidad de preparar derivados de la enzima previamente enriquecida en grupos reactivos superficiales, buscando con ello el aumento de la posibilidad de unión covalente multipuntual al mismo soporte para lograr una interacción más intensa que confiera rigidez a la estructura 3D que se refleje en ganancia de estabilidad.

Para aumentar la cantidad de grupos *amino* de la proteína en su superficie, se procedió a la modificación química con etilendiamina (EDA) de otro grupo que también se encuentra mayoritariamente en la superficie proteica por ser un grupo hidrofílico: el grupo *carboxilo*, perteneciente tanto a los residuos *Asp* como *Glu* de la cadena peptídica (60). La disposición superficial de estos grupos hace que sean accesibles y por ello fácilmente modificables con métodos relativamente sencillos.

El proceso de modificación química de los grupos *carboxilo* de la enzima nativa con EDA consta de dos pasos sucesivos: la activación de los grupos *carboxilo* con *carbodiimida* (CDI) y el posterior ataque nucleofílico de este complejo sobre un grupo



*amino* del reactivo (EDA), que a pH ácido (4,75-6,00) se encontrará protonado (64).

El control del grado de modificación química se ha realizado a través de la modificación de las condiciones en las que tiene lugar la reacción, de forma que se vea alterada la reactividad de las especies que en ella intervienen. Así se han utilizado dos concentraciones diferentes de activador (CDI):  $1.10^{-2}$  y  $1.10^{-3}$  M y se ha variado el pH del medio de reacción: pH: 4,75-5,0 y pH 6,0. El estudio ha dado lugar a tres tipos de modificación química que se han denominado: **modificación-5.2**, **5.3** y **6.2**, en alusión a los valores que toman los parámetros que se varían (pH de la reacción y concentración de CDI). En estudios previos realizados en el laboratorio con  $\alpha$ -quimotripsina inmovilizada se demostró que el grado de modificación alcanzado sobre derivados modificados-5.2 es del 100%, por modificación-6.2 del 45%, y por modificación-5.3 del 25% (67).

Para cuantificar el alcance de la modificación química conseguida en los diferentes tratamientos es necesario determinar los efectos que causan tanto sobre la actividad y la estabilidad de la enzima en solución como sobre el proceso de inmovilización, los parámetros que definen el proceso.

### 3.1. MODIFICACION QUIMICA CON EDA DE LA ENZIMA EN SOLUCION

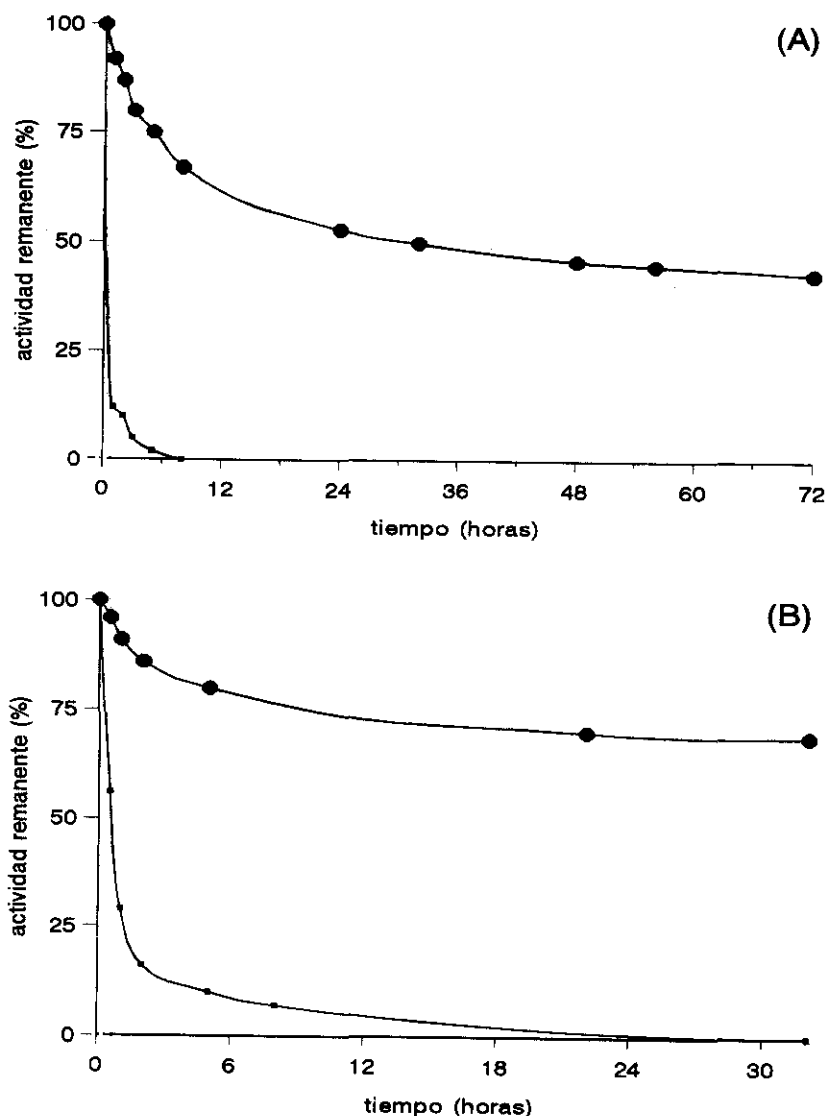
La actividad remanente de la solución de  $\beta$ -galactosidasa semipurificada después de 1,5 horas de reacción con EDA **5.2** se mantiene en el 100%. Esto indica que ni la activación con CDI ni la reacción con EDA afectan a su actividad enzimática. Lo mismo ocurre con los tratamientos más suaves: **5.3** y **6.2**.

Debido a que todas las especies implicadas se encuentran solubles, la única manera de detener la reacción es por la eliminación de los reactivos (CDI y EDA) mediante diálisis. Esto quiere decir que la reacción se verá prolongada hasta que los valores de concentración de reactivos y/o la acidez del medio hayan disminuido lo suficiente como consecuencia de la diálisis.

Una vez eliminados por diálisis los reactivos de la modificación con EDA, las soluciones enzimáticas mostrarán pérdidas de actividad enzimática bastante importantes. La modificación química-**6.2** es la que permite conservar un mayor porcentaje de actividad, el 69-76% de la actividad enzimática en relación a la que tenía la disolución nativa (semipurificada), frente al 52 y 68 % de las otras dos aminaciones-**5.2** y **5.3**,

respectivamente.

En la figura II.3 se muestra la diferencia de estabilidad de la enzima soluble modificada con EDA con respecto a la que tiene en su estado nativo, tanto a pH 7,0 como 9,0, apreciándose un claro efecto desestabilizante de la modificación química.



**Figura II.3.** Efecto de la modificación química (5.2) con EDA sobre la estabilidad térmica de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae*: (■) nativa / (●) modificada-5.2. (A) en solución en tampón fosfato 20 mM de pH 7,0 a 50°C y (B) en solución en tampón bicarbonato 20 mM de pH 9,0 a 25°C.

La CDI es un compuesto de gran reactividad frente a los grupos carboxilo y de baja estabilidad en solución, por ello es de suponer que tanto la reacción de activación de los grupos carboxilo como la reacción de éstos con la *EDA* han de tener lugar en un espacio corto de tiempo cuando las condiciones de reacción son idóneas como las que se han elegido para estos tratamientos. Por ello no parece muy probable que la modificación química haya continuado durante la diálisis afectando la actividad enzimática, de ser así alguna caída de actividad se hubiera detectado en la primera hora y media de la reacción previa a la diálisis. Posiblemente la baja actividad remanente observada se debe a la desestabilización provocada en la molécula consecuencia de la modificación química, y no a que la modificación química haya afectado a grupos esenciales para la actividad.

El control de la reactividad a través de la disminución de la concentración de CDI en el medio de  $1.10^{-2}$  M a  $1.10^{-3}$  M y/o del aumento del pH de la reacción de 4,75 a 6,0, ha permitido modificaciones químicas más suaves: **modificación-5.3** y **modificación-6.2**, reflejadas en la mayor actividad remanente después del proceso, respectivamente 52 y 64% (ver figura II.5).

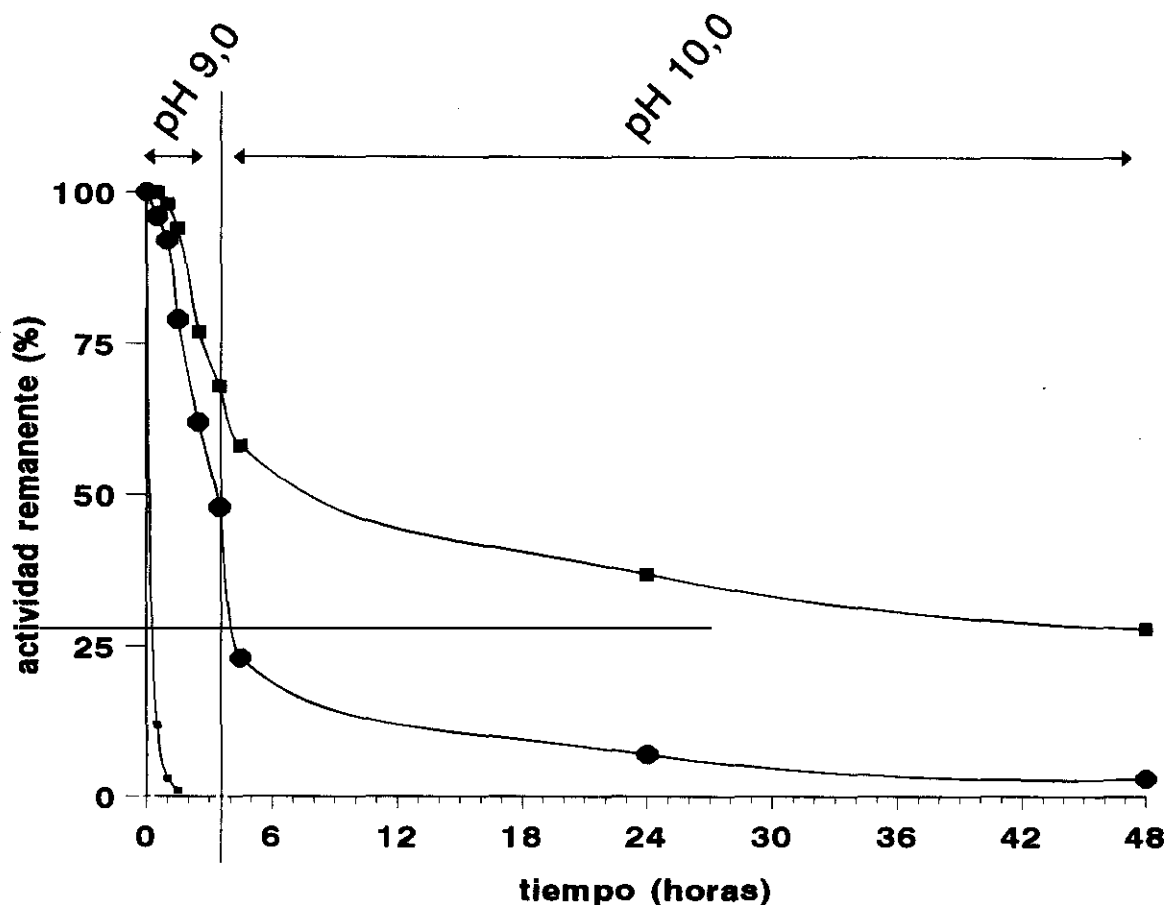
### 3.2. INMOVILIZACION COVALENTE SOBRE SOPORTE GLIOXIL-AGAROSA DE LA ENZIMA MODIFICADA CON *EDA*

Se trata de una enzima cuyos grupos *carboxilo* se encuentran modificados químicamente con *EDA* y, en consecuencia, de una proteína con grupos *amino* superficiales de dos tipos según su origen: un primer bloque formado por los **grupos amino** nativos en los que se incluyen tanto los procedentes de la cadena lateral de los residuos de *Lys* con un pK de 10,2, como el *amino* terminal de la cadena polipeptídica con un pK menor, y un segundo bloque que agrupa a los que son producto de esta modificación química con *EDA* de los *carboxilos* procedentes de los aminoácidos *Asp* y *Glu*, que también tendrán un pK bajo debido a la proximidad de otro grupo amino secundario introducido.

La presencia de estos "nuevos" grupos *amino* podría permitir la inmovilización de la enzima en un medio *menos básico* (pH 9,0), con lo que la estabilidad de la enzima en solución será mayor, favoreciéndose por ello la inmovilización en su forma activa. Una vez que se haya producido la unión al soporte en condiciones de buena estabilidad, se podría forzar la participación de los grupos *amino* originales de la enzima simplemente

con la incubación a un pH más alto (pH 10,0), con el fin de lograr una buena multiinteracción enzima-soporte.

En la figura II.4. se representa el curso de inmovilización de la enzima modificada-5.2 con *EDA*.



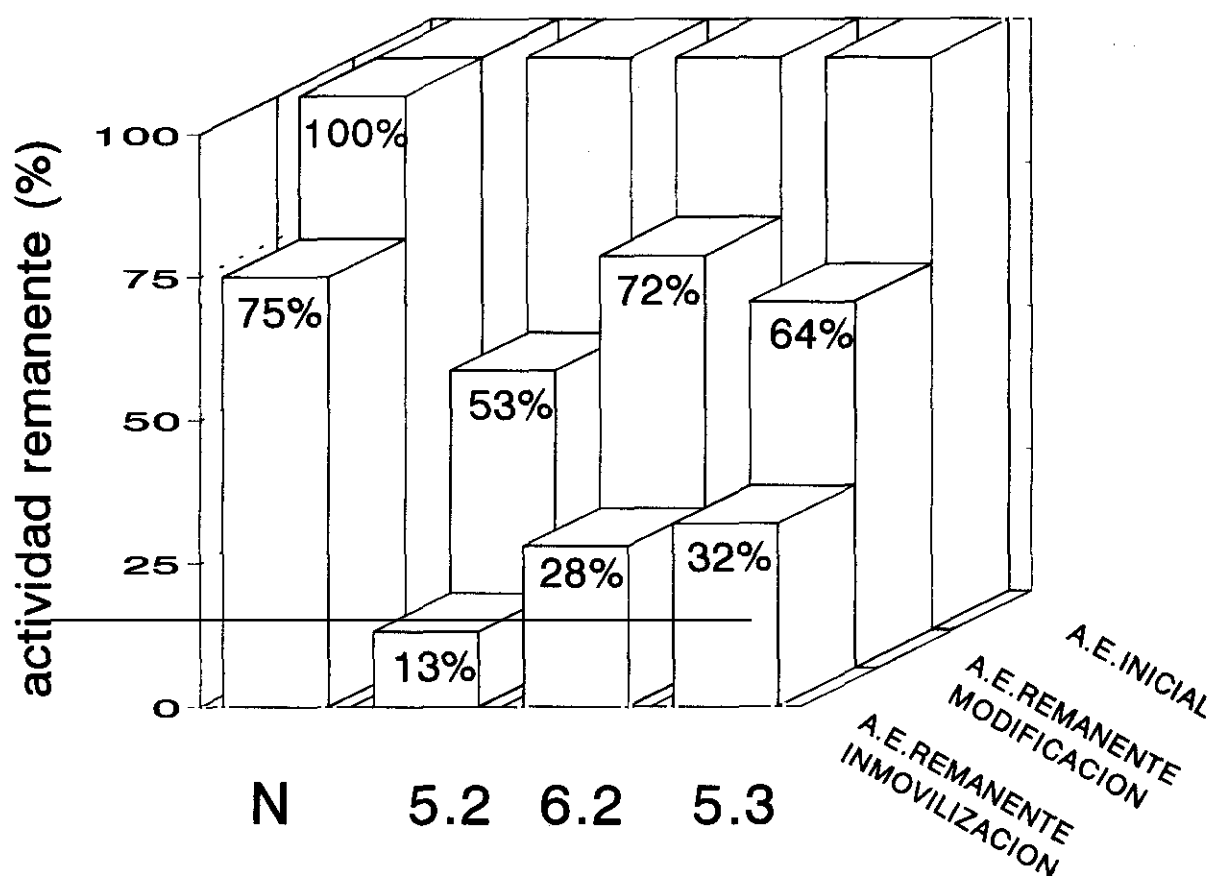
**Figura I.4.** Representación del proceso de inmovilización de la enzima modificada-5.2 sobre el soporte glioxil-agarosa-75: (■) actividad remanente de la suspensión, (●) actividad remanente del sobrenadante y (□) actividad remanente de la solución-control (enzima libre incubada en las mismas condiciones en ausencia de soporte). Condiciones experimentales descritas en *Métodos*.

La mayor reactividad de los nuevos grupos *amino* y la buena estabilidad a pH 9,0 permite la inmovilización en forma activa del 88 % de la enzima ofrecida en 30 minutos. Transcurrida hora y media se continúa la incubación a pH 10,0 para favorecer la

interacción de los grupos reactivos de pK mayor (p.e. *Lys*) y en consecuencia la reacción con el soporte por un mayor número de puntos. Así, mientras la solución de enzima libre (soluble) modificada-5.2, incubada a pH 10,0 se inactiva totalmente, la misma enzima insolubilizada previamente a pH 9,0 sobre el soporte glioxil-agarosa conserva un 25% de su actividad transcurridas 72 horas a pH 10,0.

Cuando la inmovilización tiene lugar con la enzima **modificada-5.3** y 6.2, la actividad remanente que muestran los derivados es del 46 y 38 %, respectivamente, después del proceso de inmovilización y multiinteracción covalente.

Para poder comparar el grado de modificación química con su efecto sobre la actividad enzimática, en la figura II.5 se muestran las actividades remanentes sucesivas consecuencia de la modificación química con EDA de la enzima soluble y de la inmovilización covalente.



**Figura II.5.** Efecto del control de la modificación química con EDA sobre la actividad enzimática remanente de la enzima en solución y de los derivados preparados por inmovilización. N: enzima nativa.

En todos los casos se inmoviliza el 100%, por tanto las actividades finales ensayadas de cada derivado corresponderán a la residual de los dos procesos: modificación química de la enzima soluble e inmovilización: 13, 28 ó 32% según si la modificación química haya sido 5.2, 6.2 ó 5.3, respectivamente.

A la vista de estos valores, se puede afirmar que suavizando las condiciones de la modificación química el rendimiento final de la inmovilización no se ve afectado, pero la intensidad de la interacción entre la enzima y el soporte disminuye sensiblemente manifestándose en el mantenimiento de su actividad enzimática.

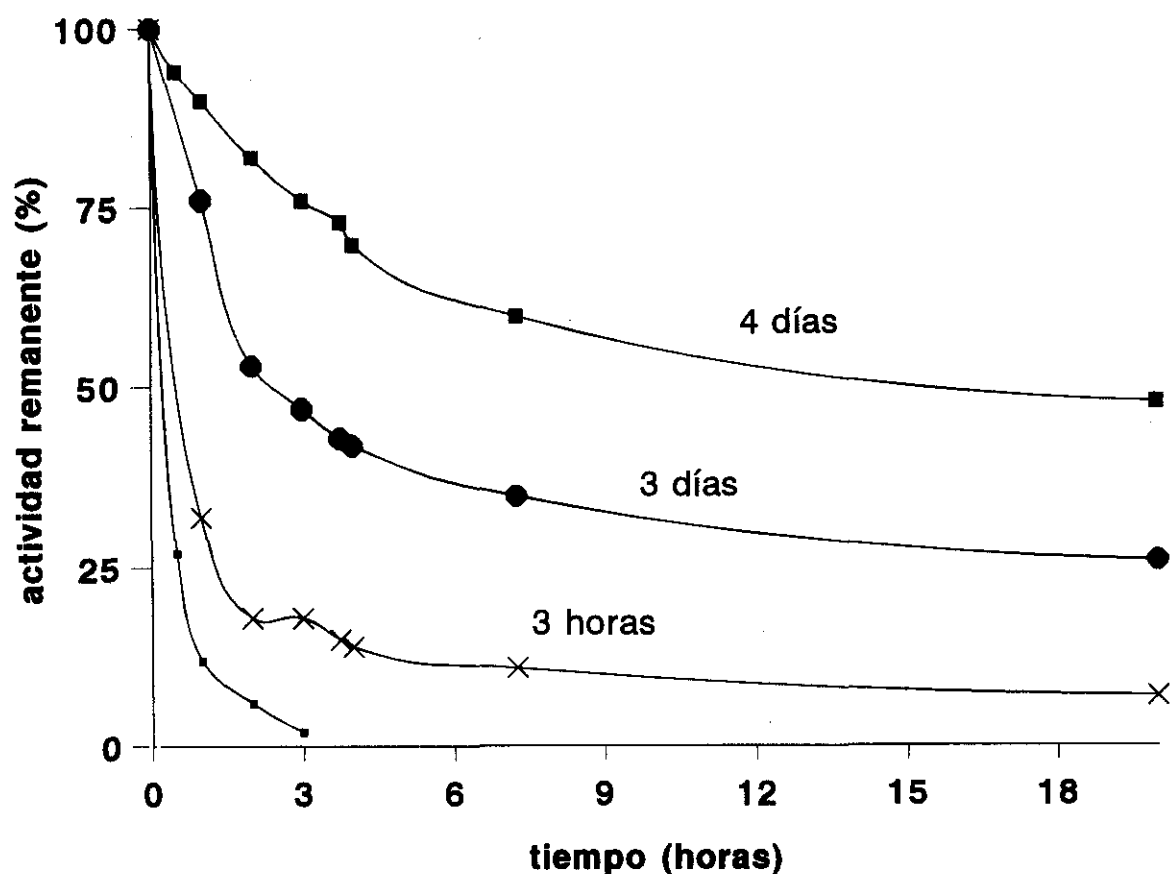
No se ha podido determinar si los mejores resultados de actividad remanente inmovilizada son debidos a una interacción menos distorsionante de la molécula (menor multiinteracción) o a una mayor estabilidad de la enzima durante el proceso. La respuesta se obtendrá del estudio de estabilidad de los derivados.

\* \* \*

El seguimiento del proceso de preparación de los derivados ha permitido tener un primer indicio de que el enriquecimiento en grupos reactivos superficiales de la enzima está permitiendo cierta multiinteracción en la unión enzima-soporte, puesta de manifiesto en la mayor estabilidad durante la incubación a pH 10,0 de la enzima unida al soporte frente a la enzima libre. Para afianzar esta hipótesis de estabilización, se ha realizado la inactivación térmica de los diferentes derivados enzimáticos obtenidos con la enzima con mayor grado de modificación química (modificación-5.2), preparados por interacciones enzima-soporte más o menos prolongadas, comparando su comportamiento con el de la enzima en solución (Figura II.6)

La incubación durante la inmovilización de la enzima aminada 5.2, una vez que se ha insolubilizado a pH 9.0, en un medio más alcalino de forma que se favorezca la participación de todos los grupos *amino* superficiales (pH 10,0), ha permitido lograr un incremento de termoestabilidad con respecto a la enzima modificada libre en solución.

Esta termoestabilización, que según se puede apreciar en la figura II.6 ya se produce con la simple insolubilización y con tiempos cortos de incubación (3 horas a pH 10,0), se vé favorecida al prolongarse la interacción (3 o 4 días a pH 10,0). Resultando un derivado enzimático obtenido por incubación durante 4 días con una **estabilidad a pH 7,0 de 40-60 veces mayor que la de la  $\beta$ -galactosidasa modificada soluble**, lo cual supone la extensión de la semivida desde unos 15-20 minutos para la enzima aminada-5.2 en solución, hasta los 20 días para el citado derivado-5.2 de 4 días.



**Figura II.6.** Influencia de la duración de la interacción con el soporte sobre la estabilidad térmica de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* modificada-5.2 con EDA e inmovilizada sobre gel glioxil-agarosa. (■) enzima soluble modificada-5.2, (x) derivado resultante después de 3 horas de incubación, (●) derivado resultante después de 3 días de incubación, y (■) derivado resultante después de 4 días de incubación. Incubación en tampón fosfato 20 mM de pH 7,0 a 50°C.

Esta divergencia en las termoestabilidades entre los derivados y la enzima modificada soluble, conseguida con el aumento progresivo del tiempo de interacción entre los grupos reactivos, indica que con la aminación de la enzima soluble se ha conseguido aumentar las posibilidades de unión de la enzima al soporte. El tiempo de contacto ha de ser suficientemente largo para permitir sucesivas interacciones que concluyan en uniones cada vez más numerosas, las cuales provocan la consiguiente rigidificación de la estructura terciaria de la cadena polipeptídica, que se manifiesta en el freno a la desnaturalización térmica ya acelerada por la modificación con EDA.

### ► Estabilización térmica frente al correspondiente derivado *unipuntual*

Se han preparado derivados de cada una de las enzimas modificadas utilizando soportes muy poco activados. La utilidad de estos soportes es el obtener derivados enzimáticos en los que la enzima se una al soporte a través de pocos enlaces de forma que su conformación no se vea afectada por la inmovilización y, en consecuencia, se pueda considerar que su comportamiento es idéntico al de la enzima en solución, pero habiéndose eliminado la posibilidad de procesos intermoleculares pues se encuentra insolubilizada. Debido a la baja activación del soporte y a que la unión covalente se realiza con tiempo de interacción corto, las posibilidades de unión enzima-soporte se reducirán enormemente, y por ello su estructura tridimensional no se verá condicionada por la presencia del soporte al permitirle cualquier movimiento o vibración determinada por el medio.

El disponer de estos derivados ha permitido, en primer lugar, cuantificar en términos relativos el grado de multiinteracción por inmovilización permitido por cada una de las aminaciones, a través de la estabilización lograda. Para ello se han realizado termoinactivaciones de cada derivado *GLIOXIL-AGAROSA-75* frente a su correspondiente derivado GLIOXIL-AGAROSA-5.

El estudio de termoestabilidad se ha realizado por incubación de los diferentes derivados en tres medios: pH 4,5, pH 7,2 y pH 9,0. Ello permite apreciar posibles diferencias de comportamiento pues la enzima nativa en un medio acuoso adquiere una estructura terciaria característica en la cual expone al medio sus zonas polares en las que se encuentra mayoritariamente los residuos hidrofílicos como *Lys* y *Asp/Glu*. Por lo tanto el pH del medio determina el grado de ionización de estos grupos, el cual fija la posición relativa de cada uno, dando lugar a una conformación determinada. Así habrá un pH del medio que de lugar a la conformación óptima del centro activo, y la incubación en un medio no apropiado modificará los equilibrios de carga en la proteína alterando la estructura 3D. Las enzimas que han sido modificadas con *EDA* presentan diferentes grupos polares superficiales con respecto a la enzima nativa, ello podría suponer alteración en el comportamiento en función del pH del medio en el que se incuba en relación al comportamiento de la enzima nativa.

En la tabla II.2 se recogen los valores de las semividas de los derivados incubados en los diferentes medios, con la intención de analizar la influencia del grado de aminación de la enzima sobre la estabilidad adicional que produce la inmovilización



multipuntual, por ello se comparan los resultados con los obtenidos al incubar en las mismas condiciones los correspondientes derivados "unipuntuales".

Derivado de $\beta$ -galactosidasa		pH 4,5	pH 7,2	pH 9,0
nativa	glioxil-agarosa-75	96	18	24
5.2	glioxil-agarosa-5	48	0,25	0,5
	glioxil-agarosa-75	480	20	120
	<i>Estabilización*</i>	10	50	240
6.2	glioxil-agarosa-5	72	2	1
	glioxil-agarosa-75	360	20	360
	<i>Estabilización*</i>	5	10	360
5.3	glioxil-agarosa-5	96	4	6
	GLIOXIL-AG-75	250	20	36
	<i>Estabilización*</i>	2,6	5	6

\* Cociente entre el valor de semivida para el derivado glioxil-agarosa-75 y para el derivado glioxil-agarosa-5. Indicador de la estabilización conseguida por la inmovilización multipuntual frente a la inmovilización "unipuntual".

**Tabla II.2.** Valores de las semividas (horas) de la incubación a diferentes pHs de suspensiones de derivados de  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* modificada con EDA en diferente grado (5.2, 5.3 y 6.2) preparados por inmovilización sobre soporte glioxil-agarosa-5 o sobre soporte glioxil-agarosa-75.

El valor de "estabilización" expuesto en la tabla II.2 para cada modificación y cada pH corresponde a la relación entre los valores de semivida del derivado multipuntual frente al unipuntual. Estos valores dan una idea de la rigidificación que supone las inmovilizaciones sobre soportes muy activados de la enzima según su grado de modificación química, por ello se ha elegido como indicador de la estabilización.

En conjunto, independientemente de la modificación química que haya sufrido la enzima, es en medios básicos (pH 9,0) en los que se observa una mayor termoestabilización consecuencia de la unión covalente a un soporte muy activado: resultando unas estabilizaciones de entre 6 y 360 veces con respecto a los derivados-control (unipuntuales), frente a 5-50 veces la relación de semividas cuando la incubación tiene lugar a pH neutro (pH 7,2) y 2,6-10 veces si el medio tiene pH 4,5.

Analizando la influencia del **grado de modificación química con EDA** de la enzima que se ha inmovilizado: la *modificación química-5.3* parece ser la más suave, pues sus derivados muestran la menor diferencia entre las estabilidades de los derivados supuestamente multipuntual y unipuntual en relación a las otras dos modificaciones químicas, independientemente del medio en el que se incube. Por el contrario, la *modificación-5.2*, parece dar lugar a una densidad de grupos *amino* reactivos sobre la superficie de la molécula tal, que permite una unión covalente al soporte más intensa capaz de proteger la estructura espacial del centro activo contra distorsiones provocadas por el medio en el que se encuentre. La *modificación-6.2* muestra una estabilización algo superior a la de la *modificación-5.3* en medios ácidos o neutros; sin embargo a pH 9,0 se comporta como el derivado más estable (360 veces más estable que su control) superando incluso la estabilización del derivado multipuntual-5.2 (240 veces más estable que su control).

### 3.3. EFECTO GLOBAL: MODIFICACION QUIMICA CON EDA + INMOVILIZACION COVALENTE MULTIPUNTUAL

Este estudio pretende analizar el efecto de la inmovilización multipuntual de la enzima modificada, ya no con respecto a la enzima modificada en solución (o insolubilizada a soporte de baja activación) sino con respecto a la enzima nativa (sin modificar). Es decir analizar el efecto global de la modificación química con EDA y de la inmovilización covalente multipuntual de esta enzima modificada.

En la figura II.7 se muestran las estabilidades de todos los derivados multipuntuales de la enzima aminada comparados con el derivado multipuntual de la enzima nativa, indicando para cada derivado la actividad remanente. En la preparación de todos ellos se ha ofrecido e inmovilizado la misma cantidad de  $\beta$ -galactosidasa.

Según se puede ver en la figura II.7 las estabilidades de los diferentes derivados enzimáticos preparados con enzima modificada con EDA en ningún caso son menores a la mantenida por el derivado de la enzima nativa: a pH 4,5 el derivado 5.2 es el que muestra mayor estabilización, siendo el derivado-5.3 el menos termoestable, a pH 7,2 las estabilidades de los derivados aminados apenas sufren variación con respecto a la enzima nativa, y, por último a pH 9,0 es la *modificación-6.2* la que ha permitido mayor estabilización por inmovilización y vuelve a ser menos estable el derivado-5.3.

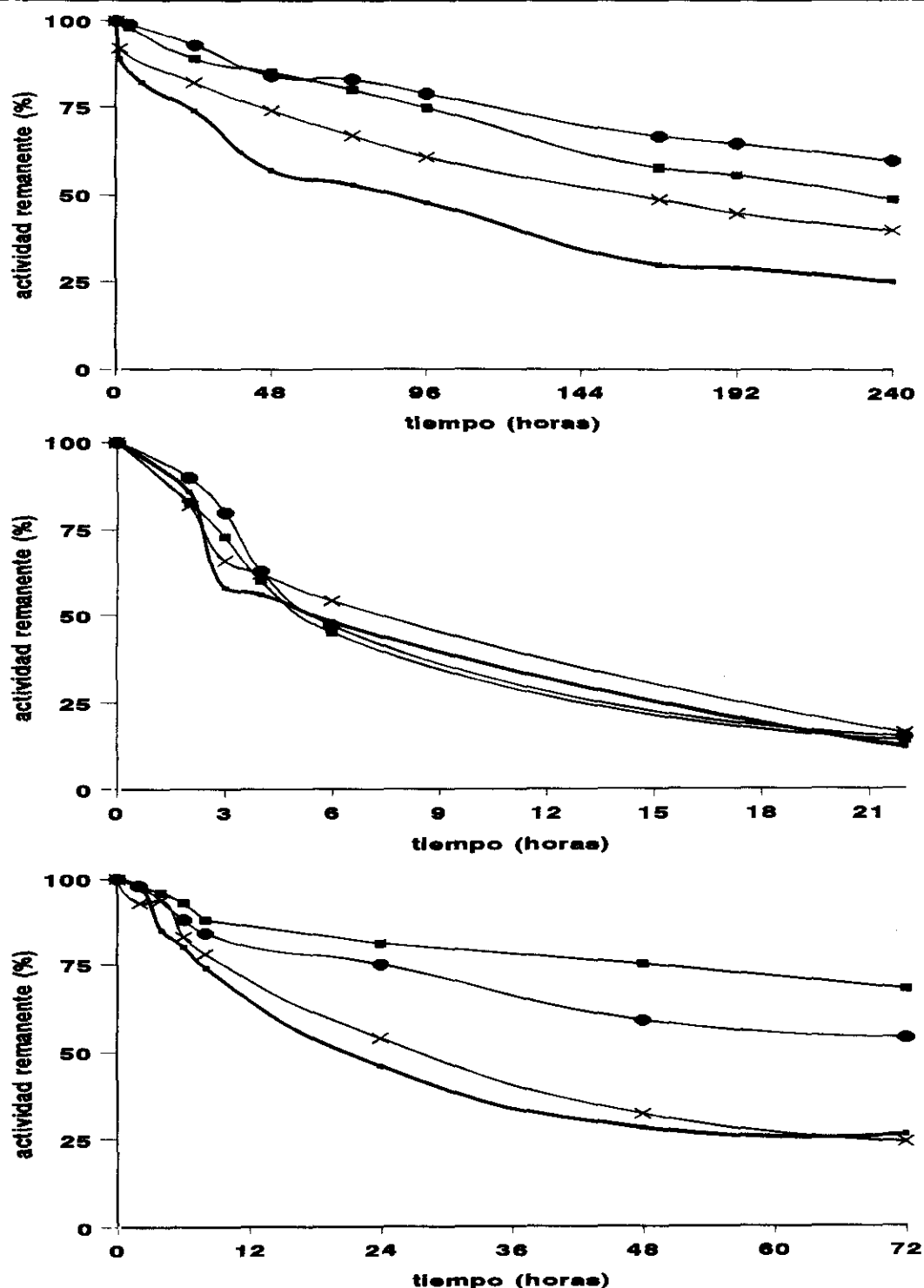


Figura II.7. Efecto del grado de modificación química con EDA previa a la inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa de *A.oryzae* sobre la estabilidad térmica de sus derivados a diferentes pH. (A) Incubación en tampón acetato 20 mM en pH 4,5 a 50°C.; (B) Incubación en tampón fosfato 20 mM en pH 7,2 a 50°C y (C) Incubación en tampón bicarbonato 20 mM en pH 9,0 a 25°C. Derivados sobre gel glioxil-agarosa de: la enzima nativa (■), de la enzima modificada-5.3 (×), de la enzima modificada-6.2 (■) y de la enzima modificada-5.2 (●).

A pH 4,5 (figura II.7A) la decisión de cuál es el derivado más apropiado el 6.2 o el 5.2 es difícil, pues el derivado-5.2, siendo el más estable, es inicialmente el que ha sufrido mayores pérdidas de actividad enzimática: conserva el 13% de la actividad que debería tener la enzima nativa. A pH 7,2 (figura II.7B), aunque la estabilización por multiinteracción con respecto al derivado sobre gel glioxil-agarosa-5 es grande, sin embargo globalmente ninguna de las tres modificaciones logra una estabilización importante frente al derivado multipuntual control (nativa-glioxil-agarosa-75). Por último en un medio de pH 9,0 (figura II.7C) la estabilización relativa global del derivado multipuntual-6.2 es la mayor, al igual que su actividad enzimática remanente (28%), por lo que sería el óptimo para trabajar a dicho pH.

En resumen, con la inmovilización multipuntual se ha logrado compensar no sólo la inestabilización que se había producido con la modificación química, sino también mejorar con respecto a la enzima soluble nativa, e incluso frente al derivado de la enzima nativa optimizado: *glioxil-agarosa-75*.

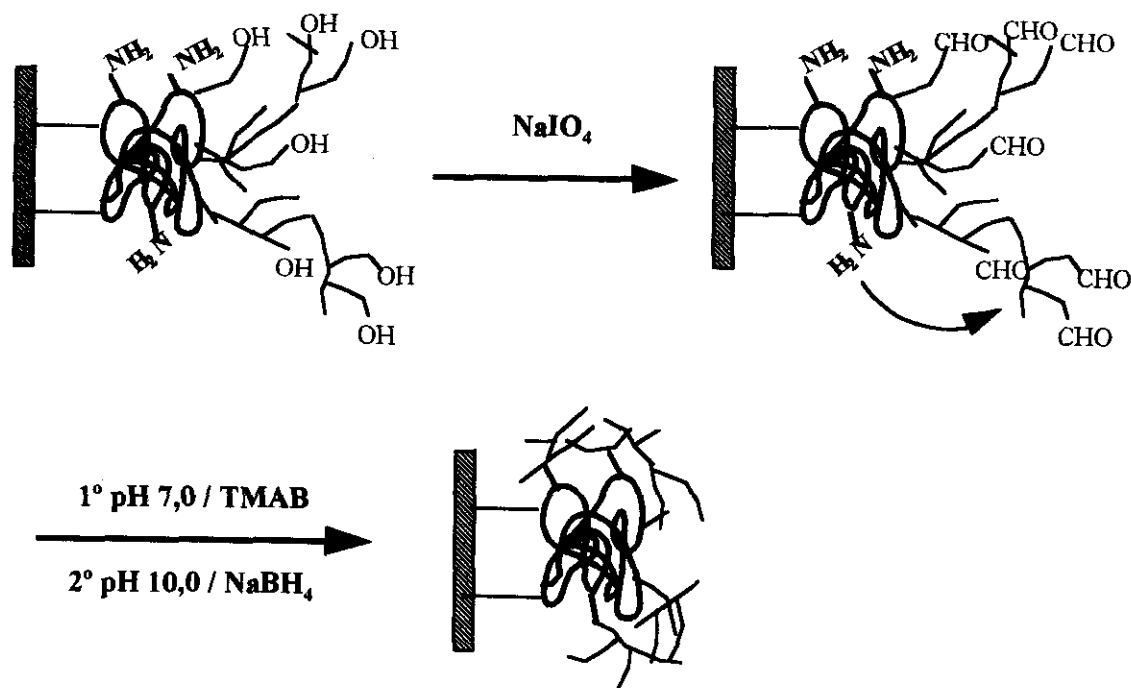
Estos experimentos confirman que el aumento de la densidad de grupos reactivos sobre la superficie de la enzima ha permitido la formación de mayor número de enlaces con el soporte, lo cual se refleja en una ganancia de termoestabilidad global, pues esta unión covalente multipuntual con la enzima modificada es capaz de compensar la desestabilización provocada por dicha modificación. No obstante, no se ha de olvidar el importante coste en actividad enzimática de todo el proceso debido a la modificación química de los grupos *carboxilo* de la enzima.

#### 4. ENTRECRUZAMIENTOS INTRAMOLECULARES

Con el propósito de introducir mejoras en cuanto a estabilización de los derivados preparados de  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae*, se ha desarrollado una segunda estrategia que consiste en la utilización de las cadenas glicosídicas propias de la glicoenzima como agente entrecruzante intrínseco. El proceso de entrecruzamiento consta de dos etapas (figura II.8):

- La primera etapa consiste en la activación de las cadenas de hidratos de carbono a través de una oxidación con  $\text{NaIO}_4$ , dando lugar a dos grupos *aldehído* por monómero, y en conjunto, a cadenas polifuncionales reactivas ("cadenas polialdehídicas").

- La segunda etapa supone la incubación de los derivados en condiciones adecuadas con el fin de favorecer la reacción de estos numerosos grupos *aldehído* con los residuos *amino* superficiales de la parte proteica.



**Figura I.8.** Esquema de la reacción de entrecruzamiento intramolecular propuesto como estrategia de inmovilización de glicoenzimas.

El estudio se ha realizado sobre el derivado multipuntual de la enzima nativa y sobre los derivados preparados con  $\beta$ -galactosidasa modificada 5.2 y 6.2 por haber permitido una multiinteracción con el soporte suficiente para lograr estabilización.

#### 4.1. ACTIVACION DE LAS CADENAS GLICOSIDICAS DE LA ENZIMA POR MODIFICACION QUIMICA CON $\text{NaIO}_4$ :

La modificación química con  $\text{NaIO}_4$  de los derivados de la enzima nativa y de la misma modificada 5.2 y 6.2 no ha afectado a sus respectivas actividades enzimáticas.

A la hora de estudiar el efecto que, sobre la estabilidad térmica a los diferentes pHs, ejerce la oxidación máxima de la fracción glicosídica, y debido a la gran reactividad de los grupos aldehído resultantes, se incuban derivados oxidados pero bloqueados rápidamente por reducción con  $\text{NaBH}_4$  para evitar su reacción durante la desactivación térmica. Estos derivados serán considerados como derivados-control. Analizando el comportamiento de estos derivados frente al derivado original se ha observado que el tratamiento con  $\text{NaIO}_4$  de las cadenas de azúcares de la **enzima nativa** inmovilizada no afecta a la estabilidad del derivado a ninguno de los pHs ensayados (pH 4,5, pH 7,0 y pH 8.8) (Tabla II.3).

Derivado de $\beta$ -galactosidasa		pH 4,5	pH 7,2	pH 9,0
nativa	glioxil-agarosa-75	96	18	24
	glioxil-agarosa-75-OX/RED	94	20	21
5.2	glioxil-agarosa-75	480	20	120
	glioxil-agarosa-75-OX/RED	97	21	40
6.2	glioxil-agarosa-75	360	19	360
	glioxil-agarosa-75-OX/RED	206	20	160

**Tabla II.3.** Valores de las semividas (horas) de la incubación a diferentes pHs de suspensiones de derivados de  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* nativa y modificada con EDA en diferente grado (5.2 y 6.2) preparados por inmovilización sobre soporte glioxil-agarosa-75 y del mismo derivado oxidado con peryodato y reducido.

Con respecto a los derivados de la **enzima modificada con EDA**, por incubación en medios neutros no parece que la modificación de las cadenas glicosídicas afecte a su estabilidad, sin embargo es importante la desestabilización que muestran cuando el estudio se realiza en medios a pH 4,5 y pH 8,8: El derivado 5.2 acorta su semivida de 480 a 97 horas a pH 4,4 y de 120 a 35 horas a pH 8,8; el derivado-6.2 muestra el 50% de actividad en 206 horas a pH ácido y en 160 horas a pH básico cuando antes de sufrir la modificación química sus valores de semivida eran ~360 horas en ambos casos. Estos resultados se recogen en la tabla II.3.

#### 4.2. ENTRECRUZAMIENTO INTRAMOLECULAR ENTRE LAS CADENAS GLICOSIDICAS OXIDADAS Y LOS RADICALES AMINO DE LA FRACCION PROTEICA DE LA GLICOPROTEINA INMOVILIZADA

La estrategia descrita en *Métodos* para la reacción de las cadenas polialdehídicas con los grupos amino de la fracción proteica se basa en la capacidad reductora de los *complejos de aminoborano* (TMAB o DMAB) en reacciones de metilación de grupos amino proteicos (35, 36).

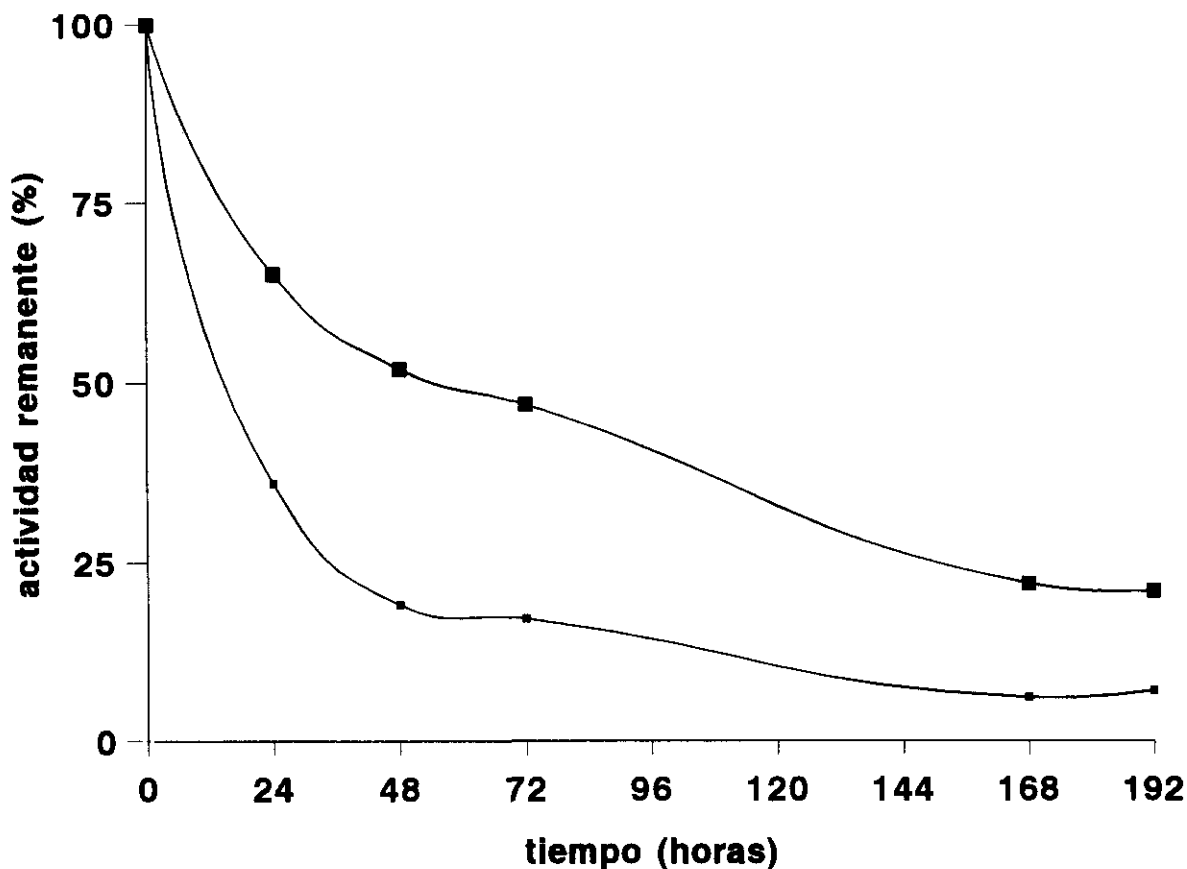
El objetivo del entrecruzamiento es conseguir que los "brazos" polirreactivos puedan acoplarse y acceder a zonas de la cadena polipeptídica alejadas de ellos y, de este modo, "envolver" la molécula de enzima. Se ha considerado que el proceso se vería favorecido si la reacción no es demasiado rápida y las cadenas tienen tiempo para adaptarse al medio. Así, se ha elegido el compuesto trimetilado (*trimetil-amino-borano* o TMAB) por presentar mayor estabilidad que el complejo dimetilado, aunque su reactividad inicial es menor. Para el entrecruzamiento se ha elegido un medio de reacción de pH 7,0 pues en medio neutros los grupos reactivos obtenidos en las cadenas glicosiladas son estables y la capacidad reductora del TMAB óptima. La concentración utilizada de agente reductor es la máxima permitida por su solubilidad. Para asegurar la irreversibilidad de los enlaces formados que no se hubieran reducido durante la incubación, transcurrida dicho proceso se procede al tratamiento con  $\text{NaBH}_4$ .

\* \* \*

Una vez activado el derivado por oxidación con  $\text{NaIO}_4$  y elegidas las condiciones en las que se favorecer la reacción entre las cadenas polialdehídicas y los grupos amino superficiales de la enzima, se procede al seguimiento del proceso de entrecruzamiento sobre el derivado preparado con la enzima nativa con el fin de estudiar la influencia del grado de oxidación sobre la actividad enzimática residual según transcurre la incubación. Después de 144 horas de incubación el derivado que fue oxidado totalmente es el único que manifiesta disminución de su actividad enzimática, conservando el 76% de la inicial.

Las oxidaciones parciales no suponen pérdida de actividad alguna. Tampoco el derivado-control que no había sido oxidado mostró caída de actividad. Ni el derivado  $\beta$ -GAL-5.2-glioxil-agarosa-75, ni el derivado  $\beta$ -GAL-6.2-glioxil-agarosa-75, oxidados al 100% mostraron alteración de la actividad enzimática en la posterior incubación para su entrecruzamiento intramolecular.

Considerado que la caída de actividad del derivado de la enzima nativa oxidado e incubado durante 144 horas podría ser el reflejo de que hubiera tenido lugar alguna modificación química de la molécula, que efecte a su estructura activa, se ensayaron las estabilidades térmicas de los derivados incubados y reducidos.



**Figura II.9.** Efecto del entrecruzamiento sobre la estabilidad enzimática del derivado de  $\beta$ -galactosidasa nativa de *A. oryzae* preparados por inmovilización sobre gel glioxil-agarosa-75: (▪) derivado oxidado y reducido (control), (■) derivado oxidado e incubado con TMAB a pH 7.0. Incubación en tampón fosfato 20 mM de pH 7,0 a 50°C.

En el caso del derivado de la enzima nativa se observa una ligera estabilización térmica solamente en medios neutros (Figura II.9) que llega a duplicar el valor de la semivida del derivado-control. Este derivado-control no es más que el mismo derivado oxidado que se ha reducido para inactivar la cadena polirreactiva e idéntico en estabilidad al derivado sin modificar con  $\text{NaIO}_4$  (derivado  $\beta$ -gal-NATIVA-glioxil-agarosa-75). Los derivados preparados con enzima aminada previamente sí muestran



termoestabilización en los tres medios ensayados y siempre en relación a sus correspondientes *derivados-control* (los mismos derivados enzimáticos oxidados y reducidos inmediatamente para evitar entrecruzamiento) como se muestra en la tabla II.4.

Derivado de $\beta$ -galactosidasa		pH 4,5	pH 7,2	pH 9,0
nativa	glioxil-agarosa-75-OX/RED	94	20	21
	glioxil-agarosa-75-ENTRECRUZADO	97	36	23
	<i>Estabilización *</i>	$\sim 1$	$\sim 2$	$\sim 1$
5.2	glioxil-agarosa-75-OX/RED	97	21	40
	glioxil-agarosa-75-ENTRECRUZADO	470	205	108
	<i>Estabilización *</i>	$\sim 5$	$\sim 10$	$\sim 3$
6.2	glioxil-agarosa-75-OX/RED	206	20	160
	glioxil-agarosa-75-ENTRECRUZADO	340	190	335
	<i>Estabilización *</i>	$\sim 2$	$\sim 10$	$\sim 2$

\*Cociente entre el valor de semivida para el derivado glioxil-agarosa-75 entrecruzado y para el derivado glioxil-agarosa-75 oxidado y reducido. Indicador de la estabilización conseguida por la inmovilización multipuntual frente a la inmovilización "unipuntual".

**Tabla II.4.** Efecto del entrecruzamiento intramolecular sobre las semividas (horas) de los derivados de  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* nativa o modificada con EDA (5.2 y 6.2) preparados por inmovilización sobre soporte glioxil-agarosa-75 en relación a los respectivos derivados-control (oxidados y reducidos). Condiciones experimentales en *Métodos*.

De los resultados expuestos en la tabla II.4 parece ser que el entrecruzamiento ha provocado ganancias de estabilidad sobre los derivados preparados con enzima aminada 5.2 y 6.2, que se reflejan en los mayores valores de semivida a los tres pHs estudiados.

\* \* \*

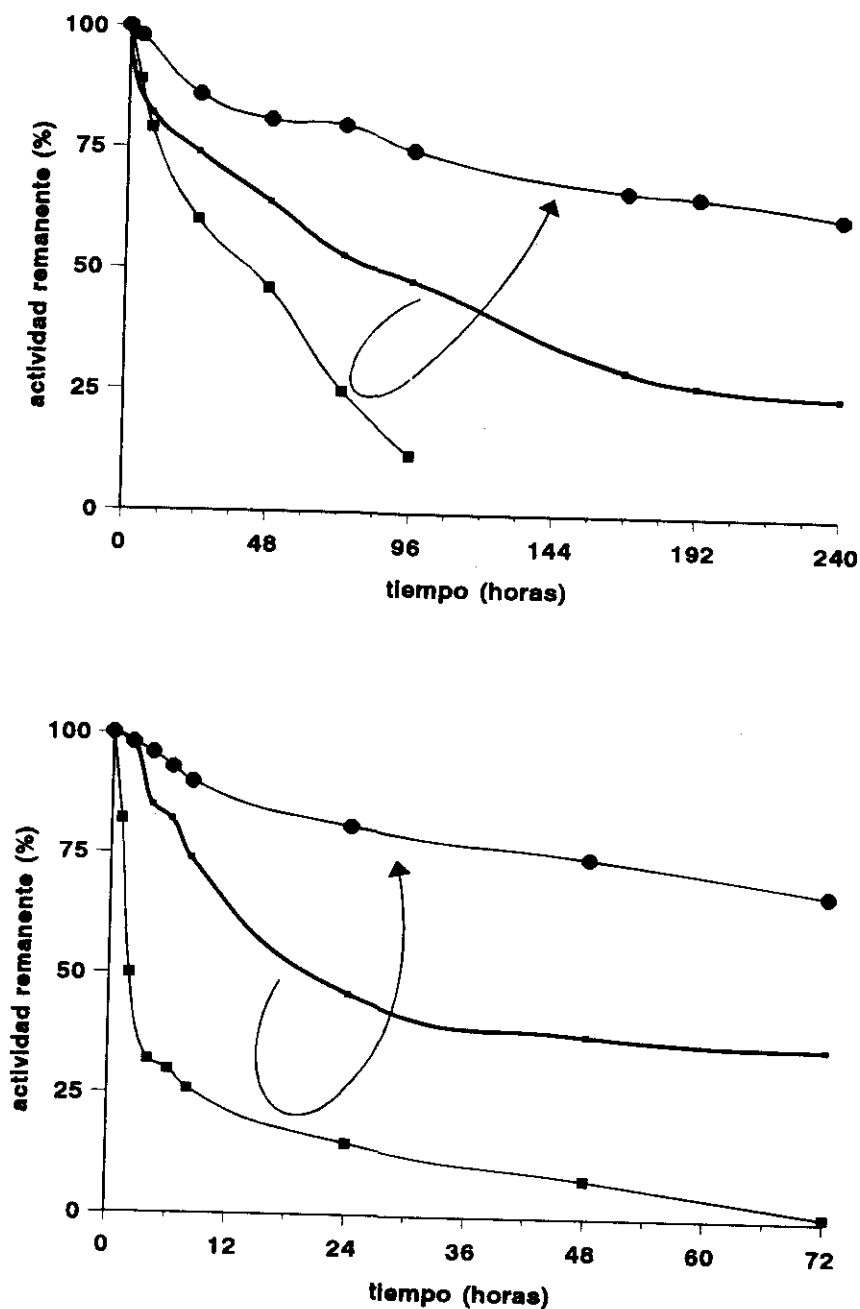
Analizando globalmente el proceso desde la oxidación hasta el entrecruzamiento, parece que esta segunda etapa consigue aumentos de la estabilidad de los derivados. Sin embargo sólo a pH 7,0 supone estabilización en relación a los derivados sin oxidar pues en este medio la oxidación no provocó desestabilización alguna. No ocurre lo mismo en el caso de las incubaciones realizadas a pHs ácido y básico en los cuales el entrecruzamiento sólo permite compensar la disminución de los valores de semividas provocados por la oxidación, sin lograr estabilización adicional.

A la vista de los resultados de actividad y estabilidad de los diferentes derivados obtenidos de ambos procesos, se puede decir que la utilización de las cadenas glicosídicas de la glicoenzima  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* como entrecruzante endógeno ha permitido la estabilización térmica de los derivados cuando éstos hayan de ser utilizados en medios neutros de reacción. El derivado de la enzima nativa ha duplicado su estabilidad a costa de una pérdida de actividad enzimática del 24%. Cuando la estrategia se aplica sobre los derivados multipuntuales preparados con la enzima enriquecida en grupos amino, la estabilización llega a ser de 600 veces para la modificación química 5.2 y de 100 veces cuando la enzima se había modificado 6.2 y el proceso no afecta a sus actividades residuales.

## 5. DISCUSION GLOBAL

Las modificaciones químicas de esta glicoproteína, alteran su estado de ionización y por tanto afectan a la estabilidad de su estructura espacial según la acidez o basicidad del medio en el que se encuentre. En particular, se ha conseguido aumentar la estabilidad térmica a pH ácido (4,5) y básico (9,0) por inmovilización multipuntual sobre gel glioxil-agarosa de la enzima, previamente enriquecida en grupos amino (figura II.10).

Aunque las estabilizaciones logradas con las modificaciones químicas 5.2 o 6.2 son muy cercanas, parece que a pH 4,5 la modificación 5.2 conduce a una estabilización algo mayor: de 10 veces frente a 5 para la modificación 6.2. Por el contrario a pH 9,0 el derivado 6.2 el que consigue mayor estabilización 360 veces frente a 240 para la modificación 5.2.

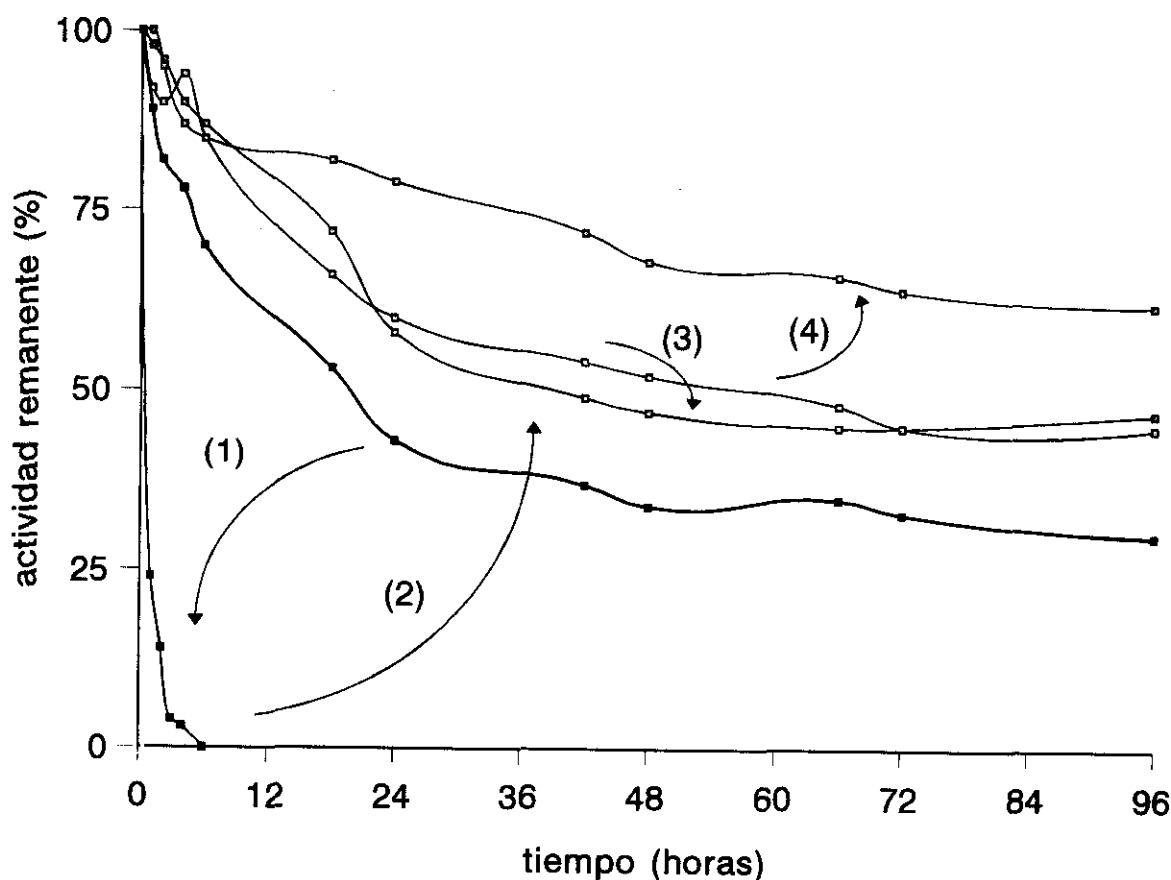


**Figura II.10. A.** Inactivaciones térmicas realizadas por incubación en tampón acetato de pH 4,5 a 50°C de los derivados de  $\beta$ -galactosidasa: 5.2-glioxil-agarosa-75 (●); nativa-glioxil-agarosa 75 (■); y 5.2-glioxil-agarosa-5 (▲). **B.** Inactivaciones térmicas realizadas por incubación en tampón bicarbonato de pH 9,0 a 25°C de los derivados de  $\beta$ -galactosidasa: 6.2-glioxil-agarosa-75 (●); nativa-glioxil-agarosa 75 (■); y 6.2-glioxil-agarosa-5 (▲).

\* \* \*

Cuando la enzima inmovilizada deba usarse en medios neutros, será necesaria una reacción adicional de entrecruzamiento intramolecular, utilizando los oligosácaridos endógenos oxidados como agente entrecruzante polifuncional.

A pH 7,0 la termoestabilización por unión multipuntual de la enzima aminada es menor que la lograda en inactivaciones a pH ácido o básico, según se recoge en el correspondiente apartado. Sin embargo el que la activación de los azúcares por oxidación no afecte a su termoestabilidad en este medio, hace que el posterior entrecruzamiento sea globalmente positivo obteniéndose un derivado 600 veces más estable que la enzima soluble modificada con EDA (Figura II.11).



**Figura II.11.** Efecto de los diferentes procesos (modificaciones químicas e inmovilización) realizados sobre la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* sobre la estabilidad a pH 7,0 y 50°C. Se indica las diferentes etapas: (1) modificación química con EDA 5.2 de la enzima soluble), (2) inmovilización multipuntual sobre soporte glioxil-agarosa-75, (3) oxidación y (4) entrecruzamiento intramolecular.

En resumen, se han preparado derivados inmovilizados covalentemente de  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* con una estabilización de 400 y 600 veces respecto a la misma enzima soluble. Para ello se han desarrollado dos estrategias fisico-químicas que han permitido la rigidificación de la estructura 3D de la enzima. La primera de estas estrategias han sido el enriquecimiento de la superficie de la enzima en grupos reactivos con el fin de que la inmovilización covalente al soporte tenga lugar a través de mayor número de puntos; de este modo se pretendió compensar el impedimento estérico que supone la presencia de las cadenas glicosídicas a la inmovilización multipuntual de la enzima. La segunda estrategia se ha desarrollado sobre los derivados inmovilizados obtenidos y consistió en la utilización de las cadenas glicosídicas como agentes entrecruzantes intrínsecos.

Estos procesos de estabilización se encuentran asociados a modificaciones químicas: la reacción de los grupos carboxilo superficiales de la enzima con EDA y la oxidación de las cadenas de carbohidratos con  $\text{NaIO}_4$ . Ello ha supuesto la modificación de la carga eléctrica superficial de la molécula y probablemente habrá alterado su comportamiento y el tipo de interacción con el medio, pudiendo ser este el motivo de los diferentes valores de estabilización alcanzados en los diferentes medio estudiados: pH 4,5, 7,0 y 9,0.

\* \* \*

## CAPITULO III

**Inmovilización-estabilización de enzimas oligoméricas: Inmovilización-estabilización de las  $\beta$ -galactosidasas de *Kluyveromyces lactis* y de *Escherichia coli* para la hidrólisis de lactosa.**

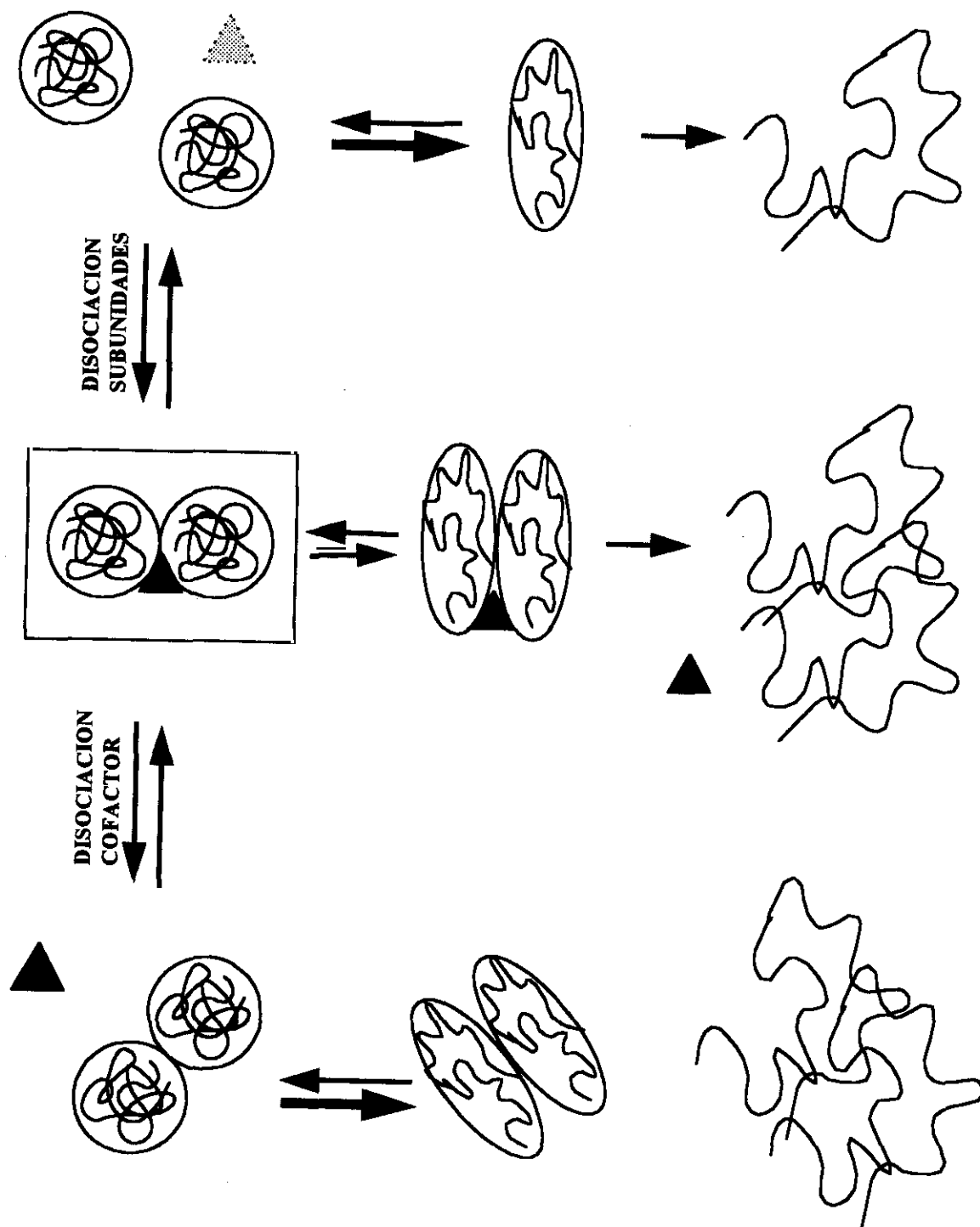
## INTRODUCCION

El abordaje de la inmovilización y de la estabilización de enzimas para posibilitar su implantación como catalizadores en reacciones a gran escala se hace más complejo al complicarse su estructura molecular. De la complejidad estructural, se derivan nuevos mecanismos de inactivación, siendo necesaria la adaptación de las metodologías para lograr el mantenimiento de su actividad enzimática.

Muchas de las enzimas que, debido a sus propiedades catalíticas, poseen interés como catalizadores de posible uso a nivel industrial son oligoméricas, es decir están formadas por dos o más cadenas o subunidades polipeptídicas, o necesitan para su actividad de la presencia de uno o más componentes no proteicos o cofactores. La relación estructura-actividad de las enzimas oligoméricas no han sido ampliamente estudiada. Aunque han aparecido publicaciones en las que las subunidades libres muestran actividad enzimática (68), en general se cree que el mantenimiento de la estructura cuaternaria es, cuanto menos, muy importante para su función biológica. Así pues, para la mayoría de las enzimas oligoméricas, las subunidades aisladas son inactivas aunque conserven intacta su estructura terciaria (69, 70), debido a que es la constitución del centro activo se ven involucrados residuos de varias subunidades del mismo oligómero (71).

A las causas de inactivación generales para toda enzima como son las interacciones intermoleculares (agregación o autólisis) o procesos intramoleculares desencadenados por diferentes agentes o condiciones del medio que actúan favoreciendo la desnaturalización o desplegamiento de la estructura tridimensional característica de la cadena polipeptídica, determinante de su actividad, habrá que añadir fenómenos de disociación que surgen debido a la naturaleza no covalente de las interacciones entre subunidades o entre la fracción proteica y los cofactores.

En la figura III.1 se recoge a modo de esquema el complejo sistema que regularía la estabilización y por lo tanto la funcionalidad de una enzima dimérica que, además necesite la presencia de un determinado ion para su actividad óptima.



**Figura III.1** Mecanismo de inactivación de enzimas poliméricas que además presentan un catión (cofactor) que interviene en el proceso catalítico.



El que predomine uno u otro de los diferentes mecanismos implicados dependerá tanto de la enzima en sí (de las diferentes interacciones intramoleculares que en ella se reúnen para mantener su configuración), como de las condiciones del medio.

La utilización de enzimas inmovilizadas a nivel industrial implica una gran dilución del catalizador, tanto por la participación de un mismo derivado enzimático en varios ciclos de reacción, como por su uso en reactores con sistemas de flujo continuo de sustrato. Esto quiere decir que los fenómenos de disociación adquirirán especial importancia. Si además esta reacción tiene lugar en condiciones experimentales moderadamente drásticas, los posibles cambios conformacionales de los protómeros disociados, acelerarían la disociación de subunidades, aumentando la velocidad de inactivación del derivado enzimático. Por otro lado, la disociación de la molécula significaría la pérdida de la fracción disociada en el eluido del reactor, lo cual contaminaría la solución producto de la reacción (72,73).

La liberación de subunidades supondría importantes limitaciones a la utilización de enzimas de cualquier microorganismo en tecnología alimentaria. Sin embargo y debido a que la estabilización de la estructura cuaternaria es suficiente para garantizar la "limpieza" del proceso enzimático pues ninguna subunidad se liberaría en el alimento, sería posible el uso de enzimas procedentes de todo tipo de microorganismos, incluso de los incluidos entre los denominados "GRAS" (*generalmente aceptados como seguros*).

Por otro lado, la estabilización de la estructura cuaternaria podría traducirse, en muchos casos, en un espectacular aumento de la estabilidad térmica de los derivados enzimáticos en procesos en los que el paso clave de la inactivación fuera la disociación de subunidades.

\* \* \*

Las técnicas biofísico-químicas de modificación de enzimas oligoméricas nativas correctamente plegadas y ensambladas podrían ser las estrategias de elección a la hora de mantener las estructuras terciaria y cuaternaria activas en los casos en los que el diseño de estrategias de ingeniería genética para unir químicamente y de en modo correcto enzimas industriales parece bastante complicado por incluir el plegamiento de cada subunidad y el posterior ensamblaje de las mismas. Es interesante la integración de los diferentes procedimientos factibles en el proceso de inmovilización, tanto por lo que supone la obtención de biocatalizadores heterogéneos de enzimas con utilidad industrial,

como por permitir el desarrollo de nuevas estrategias de estabilización sobre los derivados insolubilizados.

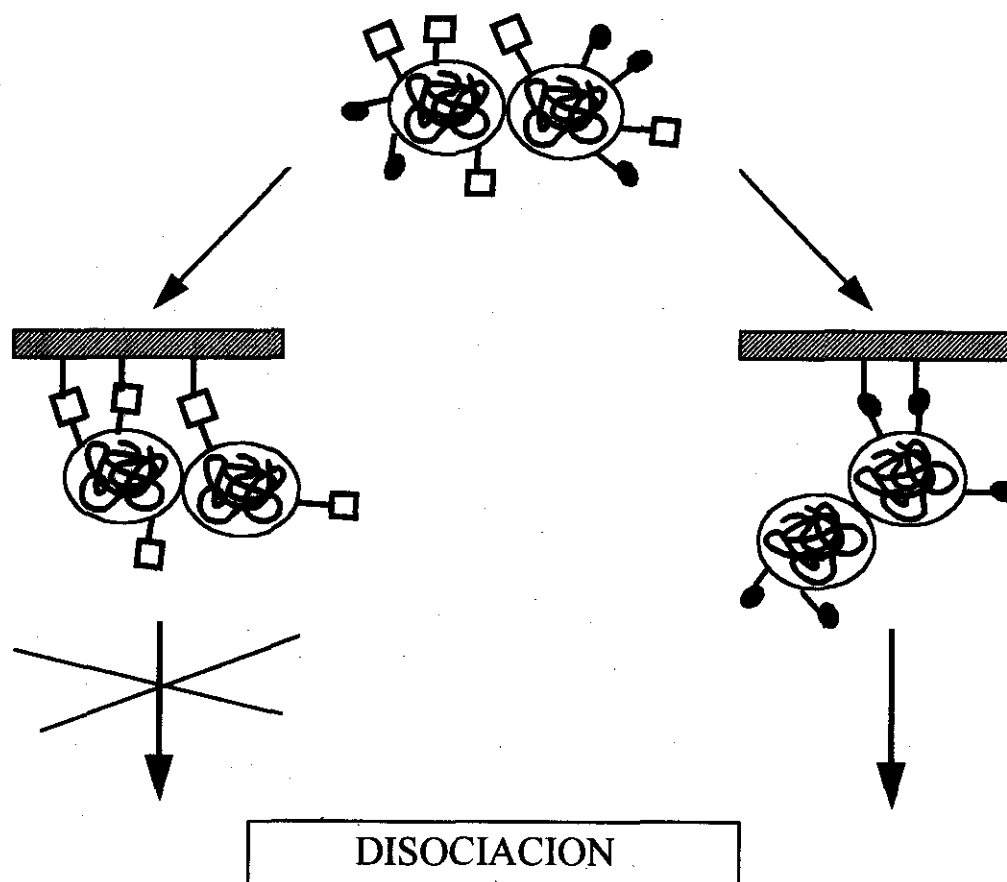
Hasta ahora, la **estabilización** de enzimas oligoméricas se ha abordado fundamentalmente a través de la utilización de agentes polifuncionales para lograr entrecruzamientos intramoleculares capaces de estabilizar la estructura cuaternaria o, por lo menos, de reducir los fenómenos de disociación (33, 74-76). Por otro lado la aplicación de estrategias de inmovilización de enzimas oligoméricas ha estado orientada a llevar a cabo estudios de la actividad catalítica de las subunidades (68) para la comparación de sus propiedades enzimáticas con las del oligómero correspondiente, o con el fin de investigar los efectos de determinados ligandos sobre una enzima alostérica y sobre uno solo de sus protómeros unido covalentemente a una matriz insoluble (74), pero no hacia la estabilización de su estructura cuaternaria.

## **1. PROPUESTAS PARA LA ESTABILIZACION DE ENZIMAS OLIGOMERICAS**

Dos son las propuestas para el tratamiento de estas enzimas en las que toma gran importancia los procesos de disociación:

### **- Inmovilización covalente multi-subunidades (Figura III.2).**

Utilizando sólidos porosos que presenten una morfología interna de superficies amplias y altamente activadas con grupos reactivos, se posibilita que en el proceso de inmovilización de proteínas oligoméricas se vean involucradas varias o todas sus subunidades, de forma que sea el mismo soporte rígido el que actúe como entrecruzante (78). Ello permite no sólo que los protómeros no puedan disociarse, sino que, aunque tendieran a hacerlo por efecto del pH o de la temperatura, mantengan una disposición favorable para el re-ensamblaje, lo cual no ocurre en el caso de un entrecruzamiento simple con reactivo bifuncional o con un polímero flexible. Evidentemente, sólidos que no presenten grandes superficies internas o que tengan un grado de activación bajo serán menos adecuados para desarrollar este tipo de estrategias, por no favorecer la interacción multipuntual enzima-soporte.



**Figura III.2.** Inmovilización covalente multisubunidades como estrategia de estabilización de la estructura cuaternaria de enzimas oligoméricas.

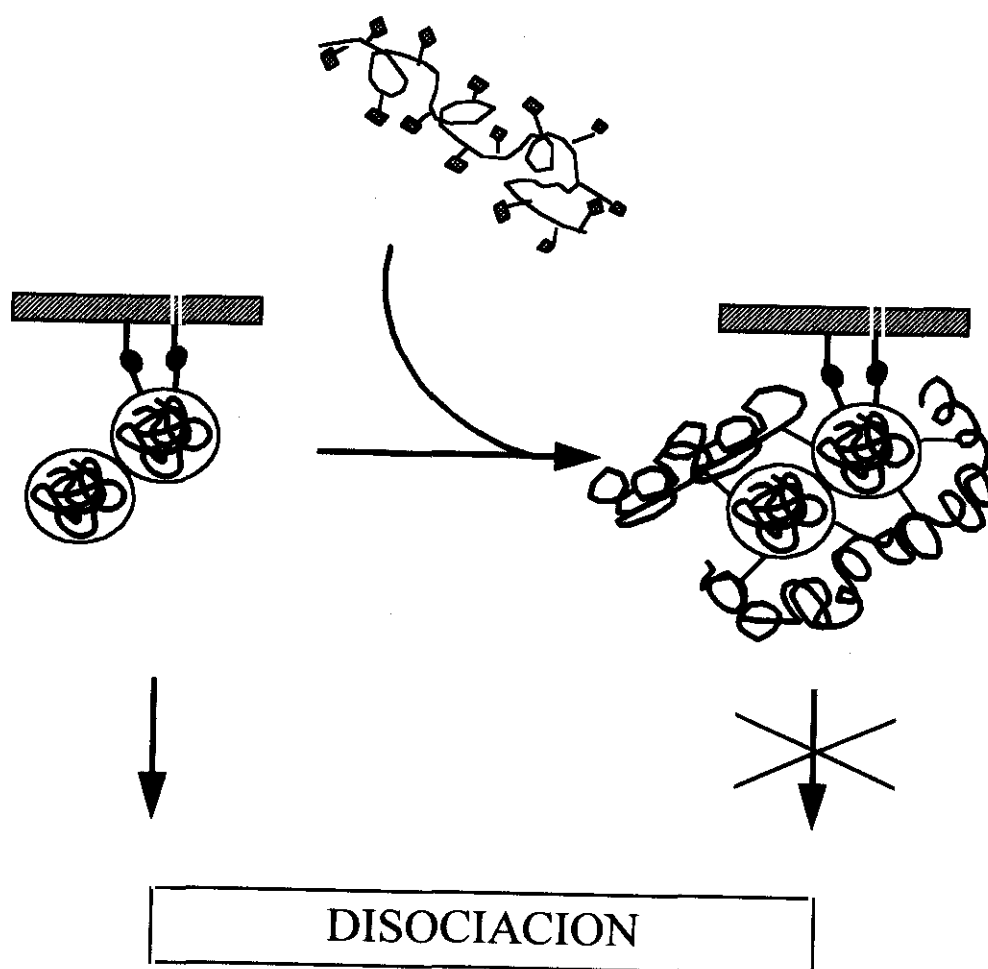
Disponiendo, además de diferentes tipos de activación para los soportes que condicionarán la inmovilización de las moléculas a través de diferentes residuos y, probablemente, a través de diferentes áreas de su superficie, se podrá evaluar cuál es la que confiere a las moléculas la orientación más adecuada para que se produzca la inmovilización multi-subunidades. En este caso, el problema de la distancia entre residuos entrecruzables es mínimo cuando se pueden preparar soportes con más de 50-100 residuos activos por molécula de proteína y por lo tanto no será tan difícil que residuos de varias subunidades intervengan en el proceso de inmovilización, siempre que su orientación sea la adecuada.

Por todo ello, esta parece la estrategia más fácil de desarrollar siempre que se utilicen los soportes, los métodos de activación, los grados de activación y los procesos de inmovilización apropiados.

### **ii.- Entrecruzamiento de subunidades con reactivos polifuncionales (Figura III.3 )**

La estabilización de la estructura cuaternaria de proteínas oligoméricas por inmovilización covalente a un soporte sólido a través de la unión simultánea de todas sus subunidades, puede dificultarse al aumentar la complejidad de la enzima, lo mismo que ocurre con la inmovilización multipuntual de enzimas monoméricas. Sin embargo, el disponer de derivados de la enzima ya insolubilizada permite desarrollar sobre ellos estrategias adicionales que permitan culminar la estabilización de la estructura cuaternaria. Por ello se propone el diseño de un primer proceso de inmovilización involucrando el mayor número de subunidades, seguido de un entrecruzamiento químico posterior utilizando macromoléculas polifuncionales.

El diseño de procesos de entrecruzamiento con reactivos bifuncionales como dialdehídos o bis-epóxidos (79-81) es muy difícil ya que, por un lado, un exceso de reactivo bifuncional debe producir una modificación global de todos los residuos de la proteína, y por otro lado, ha de elegirse el reactivo del tamaño adecuado para que sea capaz de reaccionar con dos residuos localizados en diferentes subunidades. La utilización de macromoléculas flexibles polifuncionales parece una técnica más adecuada ya que cada macromolécula que se une a un residuo de la proteína deja cubierta una zona vecina relativamente grande a la cual no podrán acceder otras macromoléculas y con la cual se encontrarán favorecidas nuevas interacciones de la misma cadena polifuncional. Por otro lado, la distancia a la que se encuentren los grupos a entrecruzar (en diferentes subunidades) ya no va a ser crítica para esta molécula larga, flexible y polifuncionalizada (76-82).



**Figura III.3.** Entrecruzamientos con agentes polifuncionales de cadena larga como estrategia adicional para la estabilización de la estructura cuaternaria de enzimas oligoméricas.

La **modificación química de proteínas en fase sólida** presenta grandes ventajas con respecto a modificaciones similares de enzimas solubles. En primer lugar, la fijación de las moléculas de enzima sobre el soporte a una distancia relativamente grande impide cualquier proceso de entrecruzamiento intermolecular y hace que la reacción de proteínas con reactivos polifuncionales produzca única y exclusivamente entrecruzamientos dentro de la misma molécula. Por el contrario, trabajando con enzimas solubles los procesos intermoleculares entre moléculas solubles, muy reactivas y con todos sus grados de libertad (rotacionales, vibracionales y traslacionales) podrían ser, incluso, mucho más

rápidos que los entrecruzamientos intramoleculares entre dos residuos fijos sobre la superficie de la proteína que, en principio no están alineados con los grupos reactivos de los agentes entrecruzantes.

Desde un punto de vista más práctico, la modificación de proteínas en fase sólida permite a la vez el diseño mucho más sencillo de los experimentos pues:

- se facilita el control de la modificación, ya que el agente entrecruzante que no ha reaccionado se encuentra en la disolución y se puede analizar sin interferencias de la proteína o del reactivo que ya ha reaccionado con ésta,
- el final de la reacción se consigue por simple filtrado del derivado, separándose de este modo todo el reactivo de la proteína insolubilizada y modificada,
- se pueden utilizar condiciones de reacción donde la proteína soluble podría agregar, máxime trabajando a las concentraciones altas (20-40 mg/ml) que se pueden conseguir con derivados inmovilizados,
- se pueden diseñar fácilmente complejas modificaciones químicas con cambio de pH, eliminación de reactivos solubles, etc.

Todas estas ventajas para trabajar a nivel de laboratorio, facilitarían enormemente el escalado de estas modificaciones, optimizadas a pequeña escala, hasta un nivel industrial.

## **2. ESTABILIZACION DE ENZIMAS OLIGOMERICAS DEPENDIENTES DE CATIONES DIVALENTES**

En muchos casos, la actividad y la estabilidad de enzimas oligoméricas están fuertemente afectadas por la presencia de cationes divalentes como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , etc. Estos cationes pueden encontrarse en la intersección entre dos subunidades formando puentes salinos entre grupos ácidos de la proteína muy próximos pertenecientes a subunidades diferentes. En ausencia de estos iones, los grupos carboxilo vecinos tenderán a repelerse provocando la disociación de las subunidades o, si ésta no fuera posible, ensamblajes incorrectos, lo cual daría lugar a la inactivación de la enzima aún sin disociar. Por otro lado, estas enzimas, al mismo tiempo que necesitan la

presencia de ciertos cationes para mantenerse activas y estables, suelen ser muy sensibles a la presencia de otros cationes divalentes que podrían reemplazar a los primeros produciéndose asociaciones incorrectas entre los protómeros. Así pues, la estabilización de la estructura cuaternaria de este tipo de enzimas multiméricas puede ser un paso necesario, pero no suficiente para conseguir un gran aumento en su estabilidad.

De todos modos, la estabilización de estas estructuras multiméricas y, cuando sea posible, la estabilización adicional de cada uno de sus protómeros podría dar lugar a importantes estabilizaciones y a minimizar la dependencia de los diferentes cationes, tanto de los que son necesarios para la enzima nativa, como de los que provocan inactivaciones. En el caso de enzimas que deban de actuar sobre fluidos lácteos, como es el caso de las  $\beta$ -galactosidasas que en el presente trabajo servirán de modelo para la aplicación de las estrategias propuestas, este tipo de procesos deben ser importantes debido a la amplia variedad de cationes presentes en estos sistemas de composición compleja.

### 3. DOS ENZIMAS OLIGOMERICAS DE INTERES INDUSTRIAL

Las  $\beta$ -galactosidasas de *Escherichia coli* y de *Kluyveromyces lactis* son dos enzimas de enorme interés industrial como catalizadores para la hidrólisis de lactosa en fluidos lácteos. La actividad óptima de estas dos  $\beta$ -galactosidasas se desarrolla a pH entorno a 7,0, lo cual permite su utilización en hidrólisis de lactosa en leche (pH 6,6) y en suero dulce (pH 6,1). Sin embargo su aplicación industrial se encuentra limitada a la obtención de derivados enzimáticos que permitan buenos rendimientos del proceso, la fácil separación del catalizador, la suficiente estabilidad de la enzima durante largos períodos de utilización, soportando temperaturas altas y grandes diluciones.

La enzima de *K. lactis* se utiliza actualmente como aditivo soluble. Al ser esta levadura un microorganismo GRAS no existen grandes inconvenientes para catalizar en un único ciclo de reacción la hidrólisis de lactosa. Sin embargo, la estructura dímica de esta enzima y la importante dependencia de su estabilidad de la presencia de cationes  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , así como su inactivación por  $Na^+$  hacen muy complicada la posibilidad de reutilización durante varios ciclos de reacción de la enzima inmovilizada.

El caso de la enzima de *E. coli* es más complejo. El microorganismo de origen no está incluido entre los GRAS, y por ello el uso de esta enzima a nivel alimentario no está

permitido.

La estabilización de la estructura cuaternaria de estas enzimas supondría un importante paso para lograr aumentar las posibilidades de uso industrial de estas enzimas y en general de cualquier otra enzima oligomérica de interés. Para ello se ha de impedir la liberación de subunidades al medio de reacción, se ha de reducir la dependencia estabilizante y/o inactivante de los cationes divalentes presentes en el medio, y, por último, se ha de aumentar la estabilidad térmica de estas enzimas y la estabilidad de los derivados durante el uso continuado en suspensiones muy diluidas durante muchos ciclos de reacción.

### 3.1. $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces lactis*

La lactasa (EC 3.2.1.23) de *Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis* es un dímero cuyas subunidades idénticas poseen un peso molecular algo mayor de 100.000 D. y se encuentra glicosilada en un 45% (p/p) (83).

La enzima tiene una actividad óptima a 35-40°C y pH 7,2 ó 6,5, respectivamente, según actúe sobre el substrato sintético (oNPG) o sobre lactosa; por enzima de esta temperatura pierde rápidamente su actividad, dependiendo de la presencia de estabilizantes, de la concentración y de determinados iones. El catión divalente  $Mn^{2+}$  y en menor proporción el  $Mg^{2+}$  protegen a la enzima de la inactivación térmica a 45°C y pH 6,6, siendo su estabilidad alta por debajo de 20°C incluso en ausencia de tales iones. La presencia de  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  provocan una fuerte desactivación, pudiendo recuperarse parcialmente la actividad por eliminación del ion del medio. Su estabilidad también depende de la concentración de  $K^+$  (84).

En cuanto al extracto enzimático comercial, *Maxilact LX-5000*, de *Gist-Brocades* (Holanda), contiene 564,5 g/l de glicerina como agente estabilizante. Es relativamente estable en presencia de iones  $K^+$  y por debajo de los 40°C. Muestra una clara dependencia de la estabilidad con la concentración de enzima en el medio (73).

La adición de  $Mg^{2+}$  a la mezcla de reacción consigue estimulación de la actividad enzimática, siendo 2 mM la concentración que permite la actividad máxima en relación a oNPG (83).



Los valores de  $V_{\max}$  de 77,6 y 123,7  $\mu$ moles de producto por min y por mg de  $\beta$ -galactosidasa para oNPG y lactosa, respectivamente y de  $K_m$  de 1,7 y 17,3 mM, respectivamente (85). Los productos finales de la reacción enzimática (glucosa y galactosa) muestran diferente poder de inhibición sobre la enzima, siendo menor el de glucosa ( $K_i^{\text{glu}}$ : 42 mM) que el de galactosa ( $K_i^{\text{gal}}$ : 794 mM) (85).

### 3.2. $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Escherichia coli*

Los estudios sobre la regulación de la producción de la  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23) de *Escherichia coli* llevaron a Jacob y Monod a proponer el primer modelo del operon para la regulación de la síntesis de proteínas (86) que todavía hoy es una de la más usadas en Biología Molecular. Sin embargo, su interés para el presente trabajo se basa en su actividad  $\beta$ -galactosidasa y en su potencial utilización como catalizador de la hidrólisis de lactosa en la industria láctea.

La determinación reciente de su estructura por rayos-X ha confirmado muchas de la características propuestas hasta entonces por diferentes autores (87). Se trata de un tetrámero cuyos monómeros idénticos (116.248 D) (88) se disponen en un plano y entre los cuales tienen lugar dos tipos de interacciones monómero-monómero (89) (Figura III.4). Cada subunidad se compone de una única cadena polipeptídica de 1,023 aminoácidos (87) que plegada da lugar a 5 dominios además de un segmento más extendido en el extremo N-terminal. Cada molécula posee dos sitios activos involucrando cada uno a un par de monómeros y en los cuales se dispone un  $\text{Mg}^{2+}$  por monómero.

Cada monómero posee 20 residuos de *Lys*, lo cual supone un número bajo para ser una cadena tan larga. De estas *Lys*, 5 se encuentran en la primera mitad de la cadena y 11 entre los residuos 515 y 772, la última es la que posee el carboxilo terminal, lo cual ha llevado a suponer que gran parte de la zona N-terminal y C-terminal se encontrarán en el interior de la molécula (87).

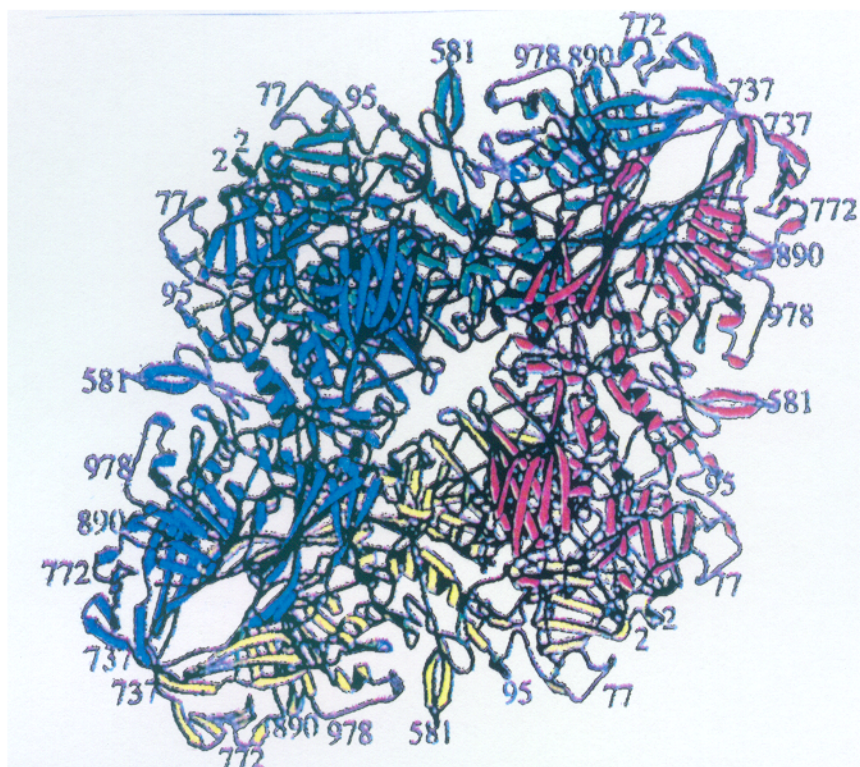


Figura III.4. Estructura del tetrámero de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (89).

En relación a su actividad catalítica y al igual que otras  $\beta$ -galactosidasas (como la de *K. lactis*) la presencia de iones ejerce importantes y variados efectos, posiblemente relacionados con su mecanismo de acción, el cual todavía no ha sido explicado en detalle(90). La presencia de  $\text{Na}^+$  provoca la activación de la enzima tanto por aumentar la afinidad hacia el oNPG como por incrementar la tasa de hidrólisis (91); los iones divalentes ejercen efectos diversos: no son necesarios para la actividad pero sí provocan activación adicional. Los agentes quelantes que unen  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  actúan inhibiendo la enzima, pudiendo recuperarse la actividad enzimática por eliminación del agente quelante y agregación de  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Ca}^{2+}$  (91).

Es una enzima muy inestable por debajo de pH 6,0 y su estabilidad decrece lentamente a pH mayor de 8,0. Su actividad máxima frente a oNPG la muestra a pH 7,2-7,4 en ausencia de Mg y en  $2 \cdot 10^{-3}$  M de este catión su pH óptimo es 6,8. A pH entre 3,5 y 11,5 tiene lugar la disociación de sus subunidades (90).

## OBJETIVOS

En este capítulo se desarrollarán diferentes estrategias propuestas para la estabilización de la estructura cuaternaria y terciaria de dos enzimas multiméricas de interés para la industria láctea: las  $\beta$ -galactosidasas de *Kluyveromyces lactis*, enzima dimérica dependiente de cationes  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  y de *Escherichia coli*, enzima tetramérica dependiente de  $Mg^{2+}$ .

En ambos casos se pretende la estabilización de la estructura cuaternaria por inmovilización simultanea de todas sus subunidades sobre soportes preexistentes activados con diferentes grupos funcionales. Cuando sea posible, se intentará que, además de la unión multi-subunidades, pueda tener lugar un intenso proceso de interacción multipuntual para favorecer la estabilización de cada una de las subunidades. Si la inmovilización no es posible realizarla con la participación de todas las subunidades, se procederá a la estabilización adicional por entrecruzamientos intramoleculares con macromoléculas polifuncionales tipo *dextrano*.

En todos los casos se estudiará la estabilización de la estructura cuaternaria mediante el análisis por SDS-PAGE, y posteriormente se evaluarán las modificaciones que permitan conservar buenas actividades enzimáticas remanentes. Se estudiarán los mecanismos de inactivación tanto de las enzimas nativas como de los diferentes derivados preparados, analizando su estabilidad térmica en diferentes condiciones experimentales y en presencia de diferentes cationes divalentes.

\* \* \*

## METODOS

### 1. ACTIVACION DEL SOPORTE AGAROSA.

En el presente capítulo se han utilizado tres soportes de agarosa que difieren en el grupo reactivo y por lo tanto en el modo de activación. Estos soportes son el *gel glioxil-agarosa*, el *gel MANA-agarosa* y el *gel glutaraldehído-agarosa*. La descripción de cada uno de los métodos de activación se encuentra desarrollada en Métodos del Capítulo I.

### 2. PREPARACION DE DERIVADOS ENZIMATICOS.

#### 2.1. PREPARACION DE DERIVADOS DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces lactis*.

##### 2.1.1. PREPARACION DEL DERIVADO GLUTARALDEHIDO-AGAROSA-3

Se prepara una solución de extracto enzimático comercial de 380 U/ml en tampón fosfato potásico 20 mM de pH 7,0 conteniendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM y KCl 0,1 M. Se separa una alícuota que se utilizará como control del comportamiento de la enzima en solución. Al resto se le añade el *gel glutaraldehído-agarosa* de 3  $\mu\text{moles}$  de grupos reactivos por ml de soporte, en relación 1:3 (v:v). Comprobado que el pH no se haya modificado, se mantiene homogénea la suspensión mediante agitación suave y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. Se le añade el mismo volumen de tampón bicarbonato potásico 40 mM de pH 9,75 conteniendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM, KCl 0,1 M y se agrega  $\text{NaBH}_4$  hasta concentración final 1 mg/ml de suspensión. Transcurrida media hora de incubación con agitación suave a pH 9,7-9,8, se procede al lavado con abundante tampón fosfato potásico 20 mM de pH 7,0 con  $\text{MgCl}_2$  2 mM y KCl 0,1 M.

### 2.1.2. PREPARACION DEL DERIVADO GLUTARALDEHIDO-AGAROSA-75

El procedimiento ha sido el mismo que se describe en el Apartado 2.1.1., con la diferencia de que el gel utilizado posee 75  $\mu$ moles de grupos reactivos por ml de soporte y se incuba en relación 1:6 (v:v).

### 2.1.3. PREPARACION DEL DERIVADO GLIOXIL-AGAROSA

Se prepara una solución de extracto enzimático comercial de unas 20 U/ml en tampón bicarbonato potásico 40 mM de pH 10,0 conteniendo  $MgCl_2$  2 mM y KCl 0,1 M a 4°C. Se separa alicuota que se utilizará como control del comportamiento de la enzima en solución y se añade el gel *glioxil-agarosa* de 75  $\mu$ moles de grupos reactivos por ml de soporte, en relación 1:10 (v:v). Comprobado que el pH y la temperatura nunca superen, respectivamente, 10,0 y 4°C, se mantiene homogénea la suspensión mediante agitación suave durante 1-1,5 horas. Una vez que se haya insolubilizado más del 50 % de la enzima ofrecida, se pasa la suspensión a temperatura ambiente y se continúa el proceso dos horas más. En este tiempo se produce la solubilización del total de la enzima ofrecida y se favorece la interacción enzima-soporte. Se agrega  $NaBH_4$  hasta concentración final 1 mg/ml de suspensión; transcurrida media hora con agitación suave y pH 9,7-9,8, se procede al lavado con abundante tampón fosfato potásico 20 mM de pH 7,0 conteniendo  $MgCl_2$  2 mM y KCl 0.1 M.

## 2.2. PREPARACION DE DERIVADOS DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Escherichia coli*.

### 2.2.1. PREPARACION DEL DERIVADO GLIOXIL-AGAROSA

Se prepara una solución de extracto enzimático comercial (0,25 mg/ml) en tampón bicarbonato 50 mM de pH 10,0 conteniendo  $MgCl_2$  2mM y lactosa 5%. Se separa una alicuota como control del comportamiento de la enzima en solución y sobre el resto se añade el gel *glioxil-agarosa* de 75  $\mu$ moles de grupos reactivos por ml de soporte, en relación 1:5. La suspensión se mantiene homogénea con agitación suave durante 20 horas. Transcurrido este tiempo se agrega  $NaBH_4$  (1 mg/ml suspensión) y, después de 30 minutos de agitación suave, se filtra y se lava con abundante tampón fosfato sodico 25 mM,  $MgCl_2$  2 mM de pH 7,0.

### 2.2.2. PREPARACION DEL DERIVADO MANA-AGAROSA

Se prepara una solución de extracto enzimático comercial (0,2 mg/ml) en tampón fosfato 20 mM de pH 7,0 conteniendo  $\text{MgCl}_2$  2mM y se enfría (4°C). Se separa una alícuota como control del comportamiento de la enzima en solución y sobre el resto se añade el *gel MANA-agarosa* de 75  $\mu\text{moles}$  de grupos reactivos por ml de soporte, en relación 1:6 (v:v). La suspensión se mantiene homogénea con agitación suave, comprobando el mantenimiento del pH y de la temperatura. A las 2 horas se permite el calentamiento de la suspensión hasta temperatura ambiente y se continúa la incubación durante 20 horas más. Transcurrido dicho tiempo se diluye la mezcla de reacción a la mitad con fosfato 20 mM de pH 6,0 conteniendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM, se ajusta el pH a 6,0 y se añade *CDI* hasta concentración final  $1.10^{-2}$  M. Después de 2 horas se filtra y se lava con abundante tampón fosfato 25 mM de pH 7,0 con  $\text{MgCl}_2$  2 mM.

### 2.2.3. PREPARACION DEL DERIVADO GLUTARADEHIDO-AGAROSA-75

Se prepara una solución de extracto enzimático comercial (0,25 mg/ml) en tampón fosfato 20 mM de pH 8,6 conteniendo  $\text{MgCl}_2$  2mM y lactosa 5%. Se separa una alícuota como control del comportamiento de la enzima en solución y sobre el resto se añade el *gel glutaraldehído-agarosa* de 75  $\mu\text{moles}$  de grupos reactivos por ml de soporte, en relación 1:5. La suspensión se mantiene homogénea con agitación suave, comprobando el mantenimiento del pH durante la incubación. Transcurridas 20 horas se añade tampón bicarbonato 20 mM de pH 10,0 conteniendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM y lactosa 5% hasta una relación 1:10 (v:v), se ajusta el pH a 10,0 y se añade  $\text{NaBH}_4$  hasta concentración final 1 mg/ml suspensión. Después de 30 minutos se filtra el derivado resultante y se lava con abundante tampón fosfato 25 mM de pH 7,0 con  $\text{MgCl}_2$  2 mM.

### 2.2.4. PREPARACION DEL DERIVADO GLUTARADEHIDO-AGAROSA-3

El procedimiento ha sido el mismo que se describe en el Apartado 2.2.3, con la diferencia de que el gel utilizado posee 3  $\mu\text{moles}$  de grupos reactivos por ml de soporte y se incuba en relación 1:2 (v:v) durante 1 hora.

### 3. PREPARACION DE AGENTES POLIFUNCIONALES

Se han preparado soluciones de polímeros polialdehídicos a partir de dextrano comercial de 6.000, 18.300 y 87.000 D, y de polímeros poliamínicos a partir de las soluciones polialdehídicas anteriores.

#### 3.1. PREPARACION DE POLIMEROS POLIALDEHIDICOS

A 50 ml de solución de dextrano 33,3 mg/ml en agua se le añaden 4,36 g de  $\text{NaIO}_4$ , agitándose hasta su completa disolución. Transcurridas 2 horas a temperatura ambiente y comprobado el consumo total de  $\text{NaIO}_4$ , se dialializa la solución resultante frente a agua.

La concentraciones en cada caso fueron 5,5, 1,8 y 0,38 mM para los dextranos 6.000, 18.300 y 87.000, respectivamente.

#### 3.2. PREPARACION DE POLIMEROS POLIAMINICOS

En un volumen de solución polialdehídica (obtenida según se describe en el apartado 3.1) se disuelve *TMAB* en concentración final 150 mM con agitación enérgica a temperatura ambiente. La solución resultante se enfría ( $4^\circ\text{C}$ ) y sobre ella se añade un volumen idéntico de EDA 0,5 M a pH 5,0 y  $4^\circ\text{C}$  en 4 fracciones distanciadas entre sí 15 minutos, cuidando el mantenimiento de la temperatura a  $4^\circ\text{C}$  de la mezcla de reacción en baño de hielo. Transcurridos 15 minutos desde la adición de la última fracción, se permite el calentamiento progresivo de la solución hasta alcanzar la temperatura ambiente y se sube su pH hasta 10,0 añadiendo NaOH. Se agrega  $\text{NaBH}_4$  hasta una concentración final 20 mg/ml y después de 30 minutos de agitación suave la solución se dializa. Es conveniente que el primer medio de diálisis sea una solución tampón de pH 10,0 para evitar la formación excesiva de  $\text{H}_2$  producto de la degradación de  $\text{NaBH}_4$ ; el resto de las diluciones pueden ser en agua destilada.

La concentración final de las soluciones obtenidas son 1,0 ó 0,14 mM, según sea el dextrano de partida 6.000 o 87.000.

#### 4. ENTRECRUZAMIENTO INTRAMOLECULAR CON AGENTES POLIFUNCIONALES LA ENZIMA INMOVILIZADA

Se han realizado tratamientos de algunos de los derivados enzimáticos inmovilizados obtenidos con los nuevos agentes entrecruzantes polifuncionales con la intención de que se produzcan entrecruzamientos intramoleculares en la enzima inmovilizada.

La cantidad de agente entrecruzante ofrecido en la reacción se expresa en moles por molécula de enzima, lo cual hace imprescindible conocer en cada caso la cantidad de enzima inmovilizada en cada derivado.

##### 4.1. ENTRECRUZAMIENTO CON POLIMEROS POLIALDEHIDICOS

Se suspende el derivado enzimático en una solución de TMAB 200 mM, fosfato 15 mM de pH 7,0 conteniendo  $MgCl_2$  2 mM, en relación 1:4 (v:v). Sobre la suspensión obtenida se agrega la cantidad de solución de polímero (*Apartado 3.1*) correspondiente a 20 moles de polímero por mol de enzima inmovilizada. Después de varias horas (3,5-144 horas) de agitación suave, se diluye hasta relación 1:10 (v:v) con tampón bicarbonato 25 mM de pH 10,0 conteniendo  $MgCl_2$  2mM, se añade  $NaBH_4$  hasta 1 mg/ml total y se continúa la incubación durante 30 minutos más. Transcurrido este tiempo se lava el derivado con fosfato 25 mM de pH 7,0 con  $MgCl_2$  2 mM y se filtra.

##### 4.2. ENTRECRUZAMIENTO CON POLIMEROS POLIAMINICOS

Se suspende el derivado enzimático en tampón fosfato 20 mM,  $MgCl_2$  2 mM de pH 6,0 en relación 1:4 (v:v). Sobre la suspensión obtenida se agrega la cantidad de solución de polímero (*Apartado 3.2*) correspondiente a 10 moles de polímero por mol de enzima inmovilizada. Después de 4 horas de agitación suave, se añade *CDI* (concentración final:  $1 \cdot 10^{-1}$ - $1 \cdot 10^{-2}$  M) y se continua la incubación durante 1,5 horas más. Transcurrido este tiempo se lava el derivado con fosfato 25 mM de pH 7,0 conteniendo  $MgCl_2$  2 mM y se filtra.



## 5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA

### 5.1. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *K. lactis*

A una cubeta con 2 ml de solución de sustrato sintético oNPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido) 5-40 mM en tampón fosfato potásico 20 mM de pH 7,0 conteniendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM y KCl 0,1 M, termostatzada a 25 °C y con agitación suave, se le añade una muestra de 25-200  $\mu\text{l}$  de solución enzimática o de suspensión de derivado. Del registro del incremento de absorbancia que se produce a 405 nm en función del tiempo transcurrido, se determina la velocidad inicial de hidrólisis para este sustrato la cual se expresa en Unidades de Actividad. Una Unidad de Actividad se define como la cantidad de enzima que es capaz de hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de oNPG por minuto a 25°C. El  $\epsilon$  del o-fenol en las citadas condiciones es 3150  $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 5.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *E. coli*

A una cubeta con 2 ml de solución de sustrato sintético oNPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido) 5-40 mM en tampón fosfato 20 mM de pH 7,0, termostatzada a 25°C y con agitación suave, se le añade una muestra de 25-200  $\mu\text{l}$  de solución enzimática o de suspensión de derivado (si la muestra tuviera mucha actividad enzimática será necesaria su dilución previa con el mismo tampón). Del registro del incremento de absorbancia que se produce a 410 nm en función del tiempo transcurrido, se determina la velocidad inicial de hidrólisis para este sustrato la cual se expresa en *Unidades de Actividad*. Una *Unidad de Actividad Hidrolítica* se define como la cantidad de enzima que es capaz de hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de oNPG por minuto a 25°C.

## 6. ENSAYOS DE ESTABILIDAD ENZIMATICA.

El proceso consiste en la medida de actividad enzimática de muestras extraídas a diferentes tiempos de una incubación de enzima soluble o derivado enzimático en las condiciones detalladas en cada caso. Se representan gráficamente los valores de actividad frente al tiempo y de este modo se pueden comparar estabilidades de diferentes derivados o del mismo en diferentes condiciones de incubación, así como determinar las vidas medias en dichas condiciones.

### 6.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DILUCION SOBRE LA ESTABILIDAD ENZIMATICA.

Se ha estudiado el comportamiento en cuanto a su estabilidad de las enzimas oligoméricas frente a la dilución, tanto sobre la enzima en solución como sobre los diferentes derivados enzimáticos obtenidos, para ello se han incubado en las condiciones indicadas para la estabilidad térmica soluciones o suspensiones enzimáticas en dos concentraciones, siendo estas siempre las mismas para poder comparar los resultados obtenidos en diferentes experimentos.

Las diluciones realizadas del extracto comercial de *K. lactis* (2150 U./ml extracto) fueron  $\sim 46$  U./ml solución) y  $\sim 0.16$  U./ml solución, siendo las suspensiones de los diferentes derivados idénticas en el caso de los derivados multipuntuales por estar más cargados y la mitad en cada caso en los derivados unipuntuales. En el caso de la enzima de *E. coli* las diluciones realizadas van desde 1 mg/ml hasta  $1 \cdot 10^{-3}$  mg/ml.

### 7. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE ACRILAMIDA CON SDS.

La separación e identificación de la enzima de interés del extracto enzimático comercial se ha realizado mediante *SDS-PAGE* (*SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) que consiste en la electroforesis de zona en gel de poliacrilamida preparado en sistemas de tampón con SDS como agente disociante. Para la preparación del gel se ha empleado el sistema de tampón discontinuo o multifásico (92,93).

El gel de separación utilizado es homogéneo con un 10% (p/v) de poliacrilamida, permitiendo la buena separación de las cadenas polipeptídicas a estudiar. Como patrones de calibración se ha utilizado una mezcla comercial de proteínas de pesos moleculares por subunidad de: 94.000 (*fosforilasa b* de musculo de conejo), 67.000 (*albumina* de suero bovino), 43.000 (*ovalbumina* de clara de huevo), 30.000 (*anhidrasa carbónica* de eritrocito bovino), 20.100 (*inhibidor de tripsina* de semilla de soja) y 14.400 ( *$\alpha$ -lactalbumina* de leche bovina).

#### Preparación de las muestras:

1º La muestra enzimática se diluye con tampón de ruptura (2x) en relación 1:2 ( $V_{\text{t. ruptura}}:V_{\text{final}}$ ), tanto si se trata de una solución proteica como de un derivado enzimático

inmovilizado. En el caso de derivado enzimático inmovilizado se habrá diluido previamente con agua en relación 1:1,1 ( $V_{\text{derivado}}:V_{\text{final}}$ ) para facilitar la toma de sobrenadante.

2º La muestra se hierva al baño-maría durante 5 minutos. Una vez que la muestra haya enfriado, está preparada para ser aplicada en el gel y proceder a la electroforesis.

3º El volumen de muestra aplicado al gel fue de 10  $\mu\text{l}$ .

\* \* \*

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces lactis*

El estudio realizado sobre la estabilización de la estructura cuaternaria de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* se ha centrado inicialmente en el comportamiento de la enzima nativa en solución. Se ha analizado el efecto de la dilución sobre el mantenimiento de la estructura cuaternaria de la molécula través de su estabilidad en condiciones óptimas, así como su comportamiento ante la presencia o ausencia de determinados cationes ( $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ) Posteriormente y para minimizar las interferencias que supondría la presencia de estabilizantes y sales del extracto comercial crudo, se ha preparado un derivado enzimático por inmovilización de la enzima a un soporte de agarosa de forma que la estructura de la molécula de enzima se vea mínimamente afectada por el proceso, manteniendo un comportamiento lo más parecido al de la enzima en solución; para estar seguro de ello, la intención es lograr la inmovilización de la enzima a un soporte por la mínima cantidad de enlaces. La última parte del trabajo estudia el comportamiento de los dos tipos de derivados multipuntuales obtenidos por inmovilización de la enzima al soporte utilizado dos estrategias de inmovilización diferentes. A partir de los resultados obtenidos se han propuesto hipótesis en relación al comportamiento de la enzima dependiendo del sistema de inmovilización y de la presencia de determinados iones.

#### 1.1. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA ENZIMA SOLUBLE

Se estudió el comportamiento de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* en solución a su pH óptimo de actividad, pH 7,0, con la intención de analizar el efecto de la dilución de la enzima sobre su estabilidad. Los experimentos se realizaron en presencia y en ausencia de cationes  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , con la intención de conocer como influyen estos iones en la estabilización de la enzima. En cada una de las curvas mostradas en la figura III.5 se representan las actividades remanentes de dos soluciones del extracto enzimático comercial siendo la relación entre sus concentraciones de 1/300 y estando incubadas en el mismo medio.

En ausencia de cationes divalentes en el medio de incubación, existe una clara dependencia de la estabilidad con la concentración a la cual se encuentra la enzima. A concentraciones bajas de enzima, la incubación a altas temperaturas desencadena una inactivación enzimática mucho más rápida. Los valores de semivida son 8 horas para la solución concentrada y 30 minutos para la solución diluida 300 veces respecto a la primera. Al encontrarse la enzima más diluida, se favorece el desplazamiento del equilibrio entre la forma asociada (activa) y disociada (inactiva) en el sentido de la disociación. Los monómeros aislados no sólo son inactivos sino que son más sensibles a posteriores distorsiones provocadas por la temperatura, acelerando de nuevo el proceso de disociación.

Cuando la incubación tiene lugar en un medio con  $Mg^{2+}$ , la solución enzimática diluida conserva mayor porcentaje de actividad enzimática residual que si este catión no esta presente. El resultado es una semivida de 8 horas para la solución concentrada y 2 horas para la solución diluida. Parece que el  $Mg^{2+}$  estaría ayudando al mantenimiento de la estructura cuaternaria de la enzima, dificultando la disociación y, en consecuencia transmitiendo mayor estabilidad al dímero.

La presencia de  $Mn^{2+}$ , unida a la de  $Mg^{2+}$  hace que el proceso de inactivación sea independiente de la concentración de enzima, conservando ambas soluciones el 50-55% de actividad después de 8 horas de incubación a 45°C.

## 1.2. DERIVADO PREPARADO SOBRE GEL GLUTARALDEHIDO-AGAROSA-3

El extracto comercial, según especificaciones comerciales, contiene estabilizantes que podrían estar interfiriendo en los resultados de estabilización obtenidos. Para evitar que los estudios realizados con la enzima nativa reflejen dichas interferencias, obteniéndose resultados no reales del comportamiento de la enzima en solución, se ha considerado la posibilidad de trabajar con la enzima inmovilizada covalentemente sobre un soporte sólido.

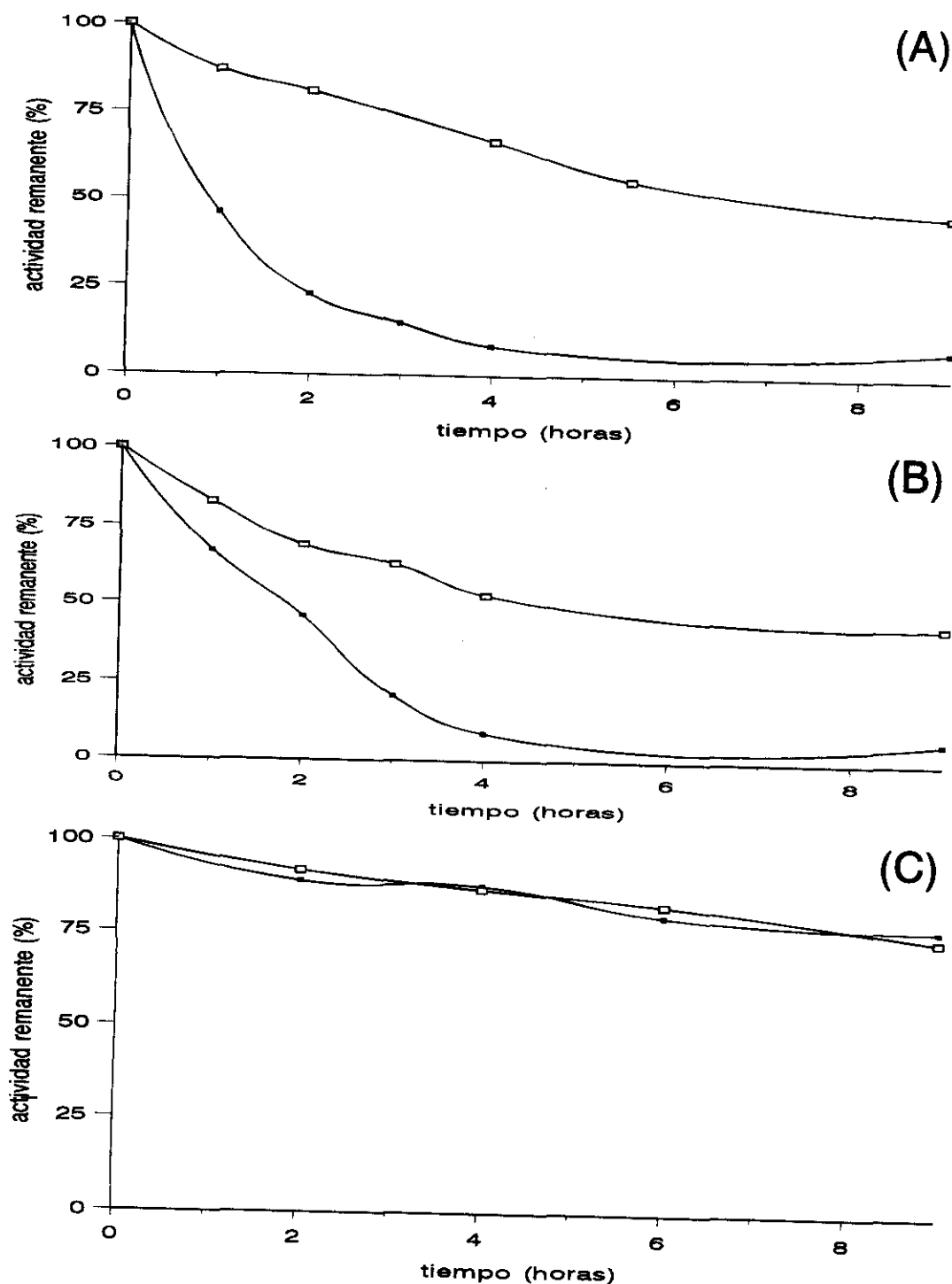
Para poder estudiar el comportamiento "puro" de la molécula de enzima la inmovilización ha de tener lugar a través de una interacción muy suave con el soporte, que afecte mínimamente a su conformación. Para ello se ha elegido un soporte como el gel glutaraldehído-agarosa de gran reactividad en medios ligeramente básicos próximos a la neutralidad (7,0-8,6), condiciones en las cuales sólo los grupos amino de

menor pK (como los aminos terminales de la cadena polipeptídica) podrían reaccionar, con una densidad superficial de grupos reactivos muy baja (3  $\mu$ moles por ml de gel), además la reacción ha transcurrido a pH 7,0 con lo cual la reactividad, incluso de los grupos amino terminales, se encuentra muy mermada, y por último, el tiempo de interacción enzima-soporte permitido ha sido corto (1 hora) para limitar, una vez producida la insolubilización a través de un enlace, la posibilidad de reacciones entre grupos amino menos reactivos de la enzima, favorecidas por la cercanía al soporte. De este modo se pretende la insolubilización de las moléculas de enzima al soporte por el mínimo número de enlaces, para no modificar su estructura ni alterar su comportamiento.

Durante la preparación de este derivado, se ha comprobado que tanto la disminución de la temperatura como la reducción de la cantidad de enzima ofrecida no permiten la inmovilización de cantidad suficiente de enzima, por ello se ha ofrecido gran cantidad de la misma y la incubación se ha realizado a temperatura ambiente.

El efecto de la dilución sobre la estabilidad del derivado obtenido se representa en la figura III.6. La ausencia de cationes en el medio permite apreciar la mayor inestabilidad térmica del derivado en función de la dilución. Cuando la enzima inmovilizada dispone de  $Mg^{2+}$  en el medio la pérdida de actividad de la incubación menos concentrada es más suave, aunque no alcanza la estabilidad de la suspensión de derivado concentrada. La presencia de  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  en el medio de incubación no sólo evita la desestabilización de la suspensión diluida, sino que mantiene la actividad enzimática de ambas suspensiones en el 100% durante 8 horas.

Los resultados reflejan el idéntico comportamiento de la enzima inmovilizada sobre el gel glutaraldehído-agarosa-3 al que mostraba la enzima soluble, tanto en ausencia de cationes como en presencia de  $Mg^{2+}$ .



**Figura III.6.** Inactivaciones térmicas del derivado de  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* preparado por inmovilización covalente sobre soporte glutaraldehído-agarosa-3 incubado en dos concentraciones diferentes: ( $\square$ ) 24 U./ml y ( $\blacksquare$ ) 0,07 U./ml, realizadas a 45°C en tampón fosfato potásico 20 mM de pH 7,0 conteniendo KCl 0,1 M: (A) en ausencia de cationes divalentes, (B) con  $\text{MgCl}_2$  2 mM y (C) con  $\text{MgCl}_2$  2 mM y  $\text{MnCl}_2$  0,2 mM.

En ausencia de cationes la disociación de subunidades es el principal mecanismo de inactivación de la enzima cuando se encuentra diluida y la presencia de  $Mg^{2+}$  es capaz de disminuir los procesos de disociación de las subunidades. Cuando además se dispone de  $Mn^{2+}$ , la dilución de la enzima deja de influir en la velocidad de inactivación, lo mismo que para la enzima en solución, sin embargo en el caso del derivado se produce una ganancia de estabilidad adicional de la suspensión enzimática que no se observa cuando el estudio se realiza con la enzima soluble, parece que el  $Mn^{2+}$  ejerce dos efectos sobre la enzima inmovilizada: reduce los fenómenos de disociación y estabiliza la conformación asociada activa. Estos resultados manifiestan que en la preparación del derivado enzimático deben haberse formado tan pocos enlaces que sólo han permitido la unión de las moléculas de enzima al soporte a través de una de sus dos subunidades, por ello los procesos de disociación no se han visto afectados por la inmovilización.

La confirmación de que el derivado obtenido posee la mayoría de las moléculas de enzima inmovilizadas a través de una de las dos subunidades idénticas que las componen se ha logrado al realizar la electroforesis del sobrenadante de una suspensión de este derivado incubado en un medio disociante y reductor (*SDS* y  $\beta$ -mercaptoetanol). En la figura III.7 se puede observar la presencia de la banda correspondiente a la subunidad de la enzima homodimérica (=100.000 D).

**Figura III.7.** Electroforesis en geles de acrilamida con SDS de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*: (P) patrón, (A) solución enzimática control, (B) derivado glutaraldehído-agarosa-75 y (C) derivado glutaraldehído-agarosa-3 y (D) derivado glioxil-agarosa-75.



### 1.3. DERIVADO PREPARADO SOBRE GEL GLUTARALDEHIDO-AGAROSA-75

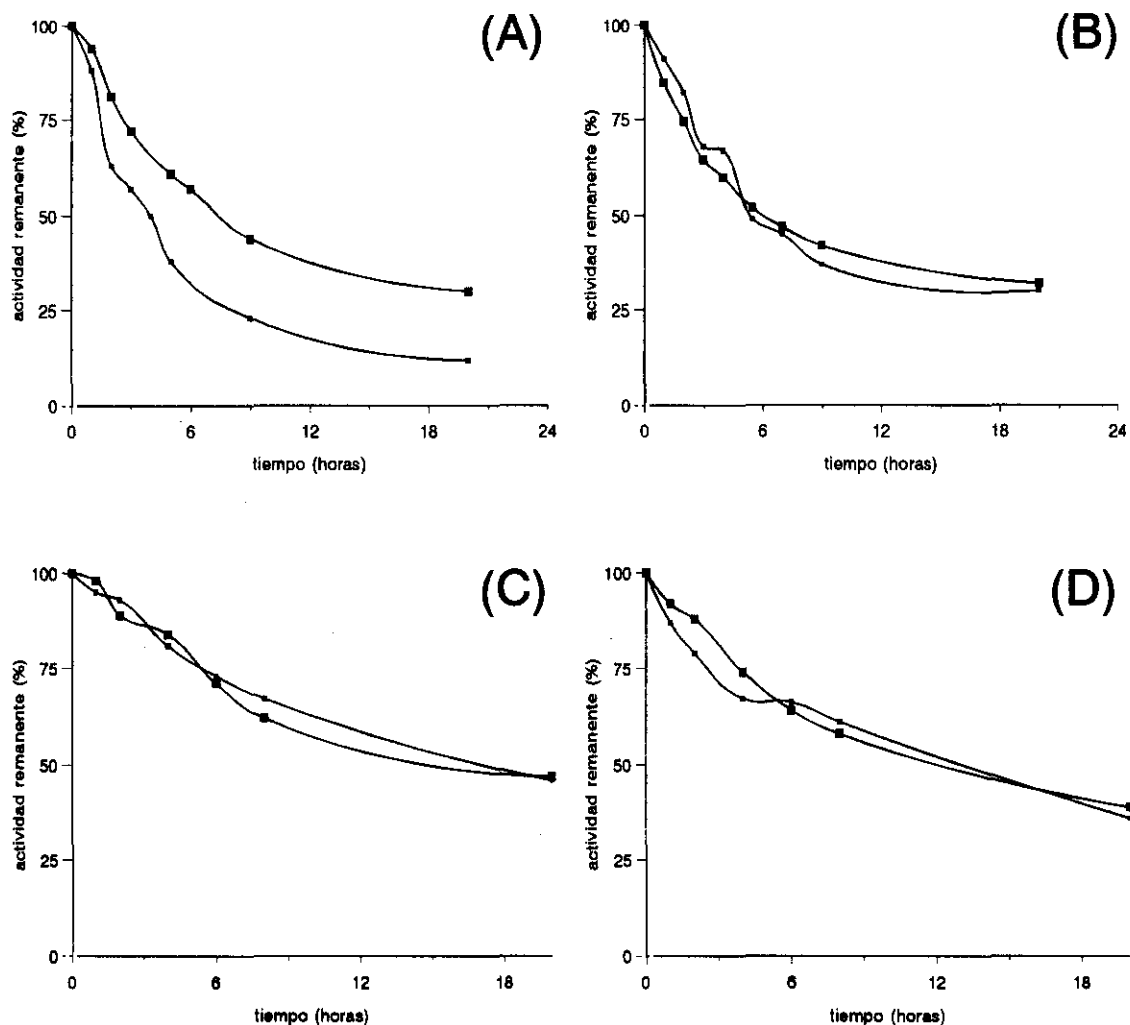
Se ha preparado un derivado enzimático utilizando el mismo soporte glutaraldehído-agarosa y en un medio al mismo pH (pH 7,0), con una densidad superficial de grupos reactivos sobre el gel máxima ( $75 \mu\text{moles grupos reactivos/ml gel}$ ) y el tiempo de interacción se ha prolongado (20 horas). De este modo se pretende que las moléculas de enzima se unan al soporte con la misma orientación que en el derivado anterior, pero esta vez a través de una interacción mucho más intensa, forzando la formación de numerosos enlaces enzima-soporte.

Al realizar la electroforesis del sobrenadante resultante al final del proceso de inmovilización sobre el soporte glutaraldehído-agarosa-75 se ha comprobado que toda la proteína del extracto comercial que se había ofrecido inicialmente al soporte se ha inmovilizado, tanto la correspondiente a la banda de 100.000 D como otras proteínas que se detectan de una muestra diluida del extracto enzimático comercial utilizado.

Cuando en el gel de electroforesis se aplica una muestra del sobrenadante de una suspensión del derivado enzimático incubado en SDS y mercaptoetanol (Figura III.7) se comprueba que no se libera ninguna cadena polipeptídica, ni de las correspondientes a la subunidad, ni de las otras proteínas que impurifican el extracto comercial que sí se habían unido al soporte. Se puede, por lo tanto, asegurar que ha tenido lugar la unión covalente de la  $\beta$ -galactosidasa al soporte a través de sus dos subunidades pues el tratamiento disociante no consigue la aparición de monómeros en el sobrenadante.

\* \* \*

Realizando inactivaciones térmicas de suspensiones de este derivado en el que se ha confirmado la unión al soporte por ambas subunidades, se ha observado que en ausencia de cationes divalentes la inactivación debida a la dilución es mucho menos importante de lo que lo era tanto para la enzima libre en solución, como para la enzima inmovilizada a través de uno de sus dos monómeros (Figura III.8 A). Cuando la inactivación se realiza en un medio con  $\text{Mg}^{2+}$ , los valores de semivida son independientes de la concentración de enzima en la suspensión (Figura III.8 B). Por incubación en presencia de  $\text{Mn}^{2+}$ , independientemente de que además se encuentre presente  $\text{Mg}^{2+}$ , tiene lugar, por un lado la inactivación independiente de la dilución y, por otro lado la estabilización adicional de las suspensiones enzimáticas, sus semividas se duplican en relación a las obtenidas con  $\text{Mg}^{2+}$  (Figura III.8 C y D).



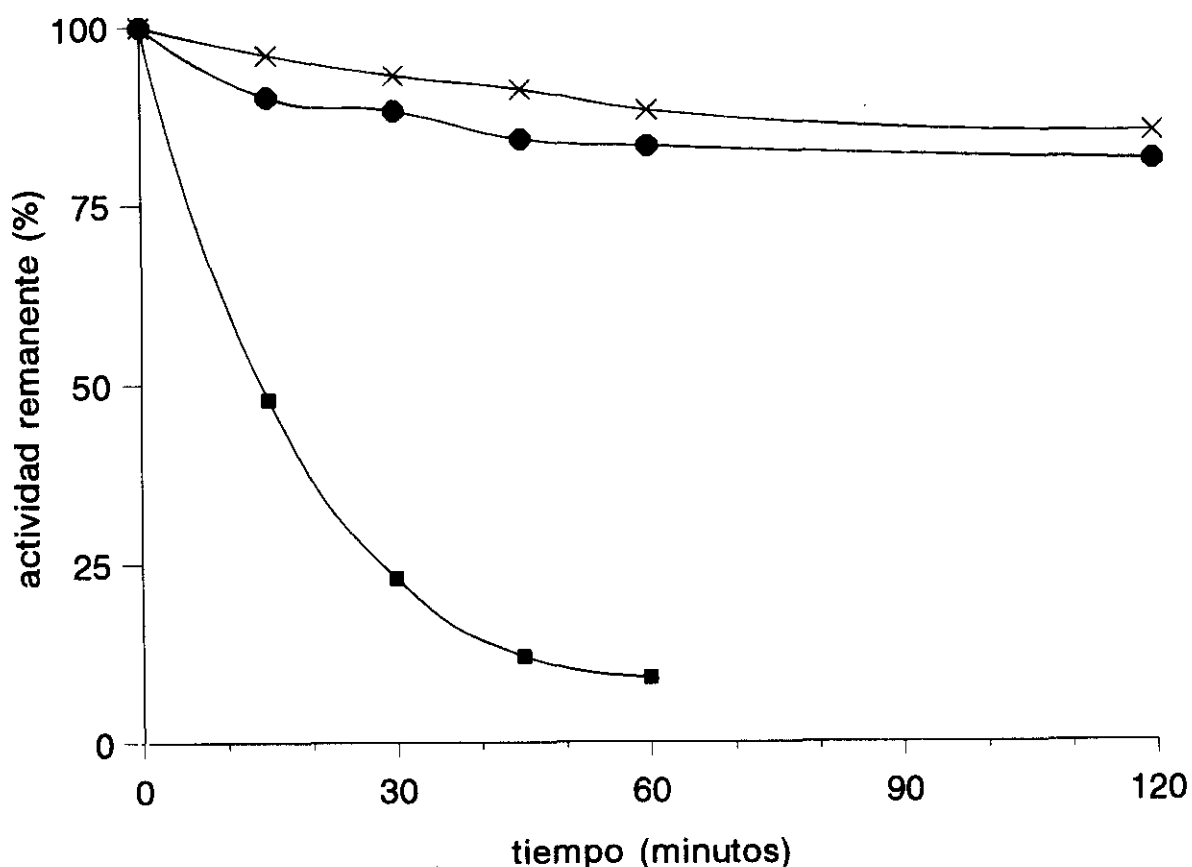
**Figura III.8.** Inactivaciones térmicas del derivado de  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* preparado por inmovilización covalente sobre soporte glutaraldehído-agarosa-75 incubado en dos concentraciones diferentes: (■) 45 U./ml y (●) 0,16 U./ml, realizadas a 45°C en tampón fosfato potásico 20mM de pH 7,0 conteniendo KCl 0,1 M: (A) en ausencia de cationes divalentes, (B) con  $\text{MgCl}_2$  2 mM, (C) con  $\text{MnCl}_2$  0,2 mM y (D) con  $\text{MgCl}_2$  2 mM y  $\text{MnCl}_2$  0,2 mM.

En resumen, el  $\text{Mg}^{2+}$  parece ser capaz de anular los procesos de inactivación dependientes de la concentración, haciendo independientes: velocidad de inactivación térmica y concentración de enzima en la mezcla de incubación y la presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  en el medio no sólo evita la dependencia de la estabilidad de la concentración, sino que además alarga la vida media de la enzima incubada.

#### 1.4. DERIVADO PREPARADO SOBRE GEL GLIOXIL-AGAROSA-75

El soporte glioxil-agarosa es capaz de reaccionar con los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos *Lys*, disponibles en gran cantidad en la superficie de la mayoría de las enzimas, por ello en el presente trabajo se ha propuesto su utilización para la inmovilización multipuntual de esta enzima.

Antes de intentar la inmovilización se ha estudiado si la estabilidad de la enzima en solución le permite mantener la suficiente actividad en un medio tan básico como el necesario para el proceso de interacción enzima soporte (pH 10,0). En la figura III.9 se representan gráficamente las actividades enzimáticas remanentes respecto al tiempo transcurrido de incubación de la enzima concentrada en solución a 4°C y pH 10,0, a 20°C y pH 9,4, y a 20°C y pH 10,0.



**Figura III.9** Estabilidades térmicas de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* soluble incubada en tampón bicarbonato potásico 40 mM conteniendo  $MgCl_2$  2 mM y KCl 0,1 M : (x) de pH 10,0 a 4°, (●) de pH 9,4 a 20°C y (■) de pH 10,0 a 20°C.

La inestabilidad de la enzima a 20°C en un medio de pH 10,0, obliga a plantear la inmovilización en dos etapas: una primera etapa a 4°C y pH 10,0 con la intención de simplemente insolubilizar la enzima en su forma activa sin pretender una unión muy intensa de las moléculas al soporte y una segunda etapa en la que se permite el calentamiento progresivo de la mezcla enzimática hasta alcanzar la temperatura ambiente manteniendo el pH 10,0 con lo cual se favorece la interacción a través de más grupos de la proteína insolubilizada con el soporte. Durante el transcurso de esta segunda etapa, el control de la actividad remanente de la enzima inmovilizada permite llegar a una solución de compromiso entre la duración de la incubación en busca de mayor número de interacciones enzima-soporte y el porcentaje de actividad remanente de la enzima inmovilizada.

El curso de la inmovilización se ha recogido en la figura III.10. En ella se representa: la actividad residual de una solución enzimática (solución control) con la misma concentración y en idénticas condiciones que la ofrecida al soporte, para evaluar el comportamiento de la enzima en solución; la actividad enzimática del sobrenadante de la suspensión en la que sucede la inmovilización, que reflejará tanto las pérdidas de actividad de la enzima soluble por las condiciones del medio como la insolubilización de la enzima sobre el soporte; y, por último, la actividad total de la suspensión enzimática que recoge la de la fracción soluble como la insolubilizada.

Del análisis de los resultados (Figura III.10) se deduce una mayor velocidad de inactivación de la enzima soluble (solución control) respecto a la suspensión, teniendo en cuenta que la fracción soluble de la suspensión se comporta de forma idéntica a la solución control, la mayor actividad remanente de la suspensión es debida a la fracción de enzima que ya se encuentra inmovilizada, lo cual indica que la simple insolubilización provoca cierta estabilización. Esta estabilización se ve favorecida con el aumento de la temperatura y la prolongación de la incubación enzima-soporte, al menos durante la primera hora de incubación a 20°C.

El resultado final es la inmovilización del 100% de la enzima ofrecida, en condiciones en las que la enzima en solución pierde prácticamente toda su actividad (actividad residual de la disolución-control: 8%), conservando una actividad remanente del 40-45% en el derivado enzimático. La unión de la enzima al soporte glioxil-agarosa-75 ha significado estabilización de la enzima en medio básico.

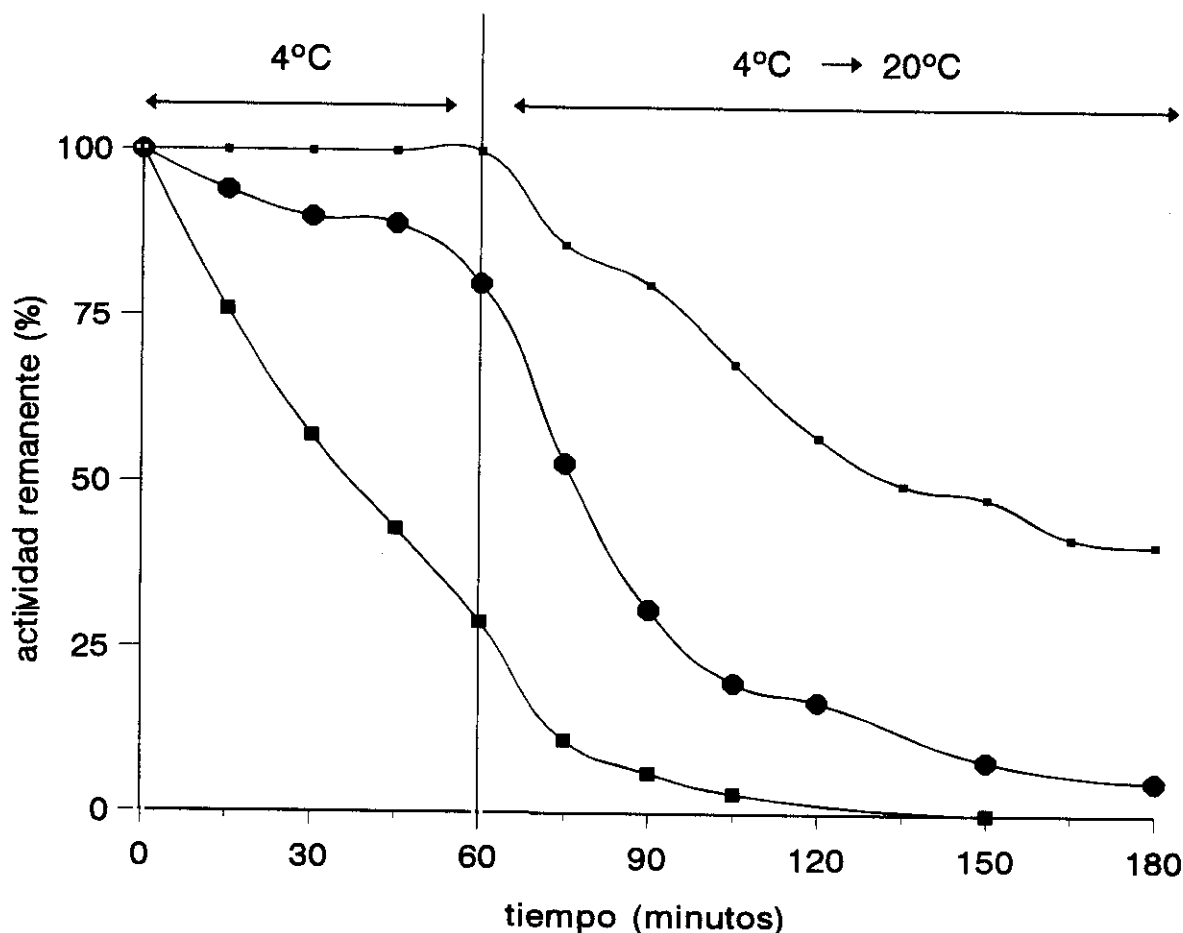


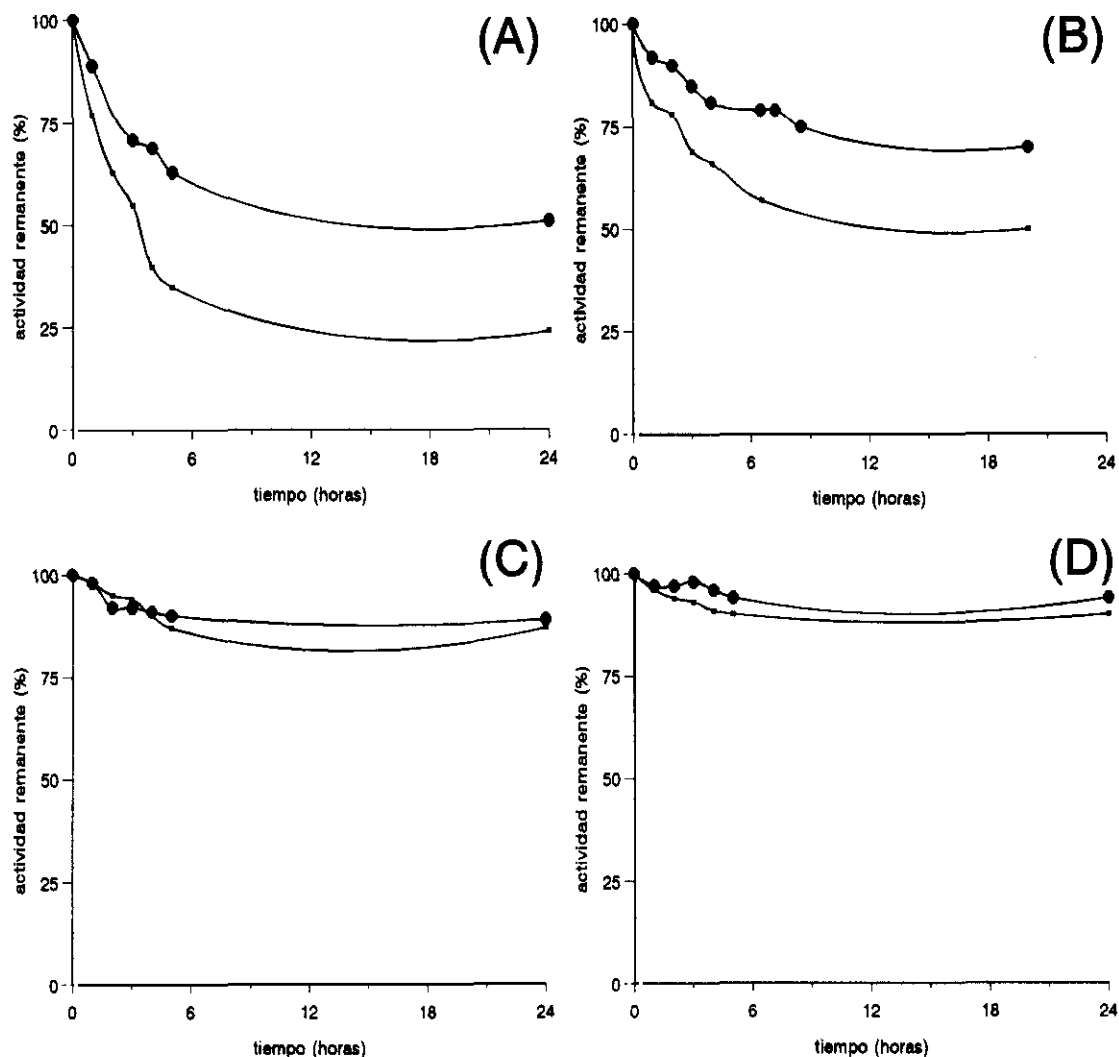
Figura III.10. Curso de inmovilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* sobre gel glioxil-agarosa-75: suspensión (■), solución-control (soluble) (●) y sobrenadante (▲).

### ► Efecto de la dilución y de la presencia de cationes divalentes sobre la estabilidad del derivado glioxil-agarosa-75

La electroforesis realizada (Figura III.7) manifiesta la ausencia de proteínas en el sobrenadante de una suspensión de derivado glioxil-agarosa-75 incubado en condiciones reductoras y disociantes, lo cual indica que el soporte utilizado para la inmovilización así como las condiciones en las que ésta se ha llevado a cabo han permitido la unión de todas las proteínas del extracto comercial y, concretamente en el caso de oligómeros (como es la  $\beta$ -galactosidasa que se está estudiando), esta unión ha tenido lugar a través

de ambas subunidades.

Los resultados en cuanto a la estabilización lograda por la inmovilización se representan en la figura III.11:



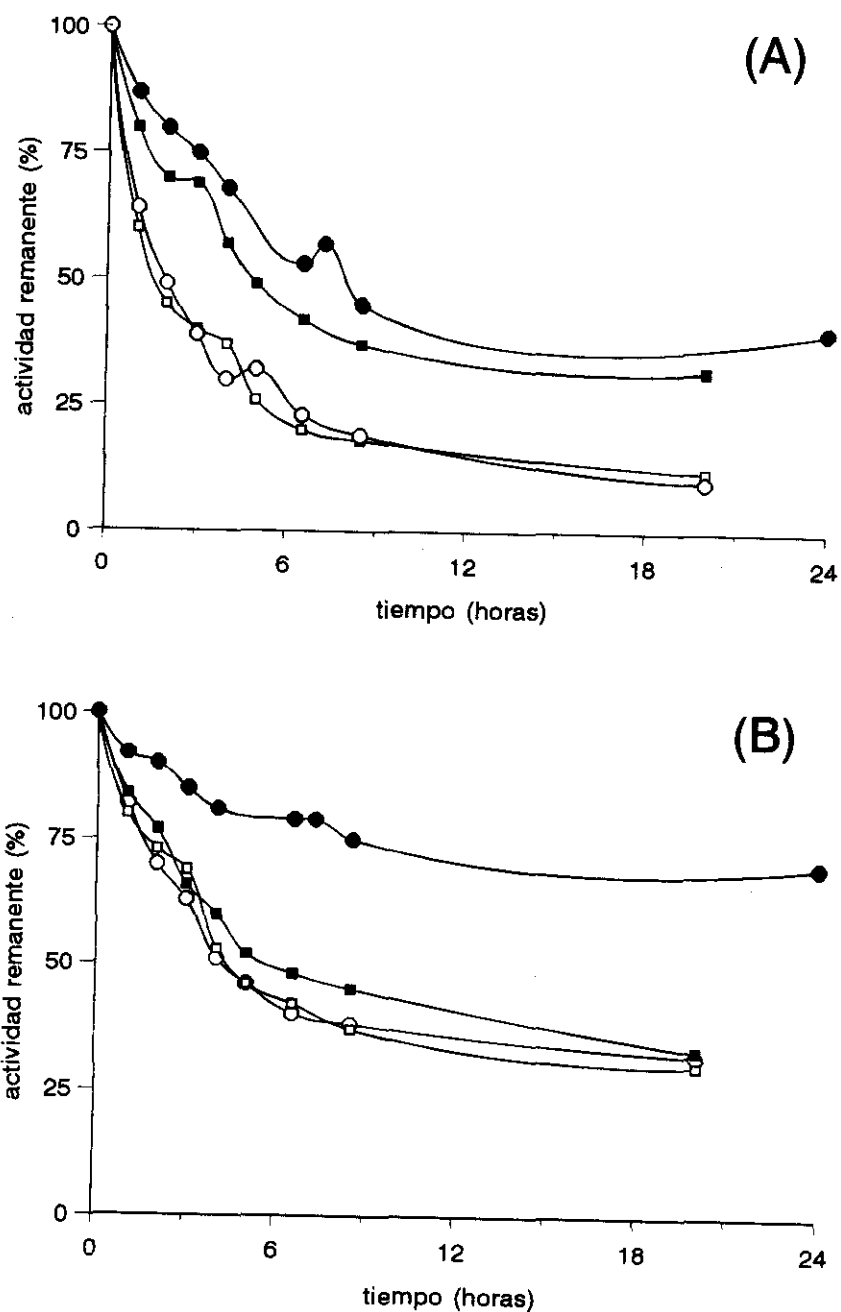
**Figura III.11.** Inactivaciones térmicas del derivado enzimático preparado por inmovilización covalente sobre soporte glutaraldehído-agarosa-75 incubado en dos concentraciones diferentes: (●) 45 U./ml y (■) 0,16 U./ml, realizadas a 45°C en tampón fosfato potásico 20 mM de pH 7,0 conteniendo KCl 0,1 M: (A) en ausencia de cationes divalentes, (B) con MgCl<sub>2</sub> 2 mM y (C) con MnCl<sub>2</sub> 0,2 mM, y (D) con MgCl<sub>2</sub> 2 mM y MnCl<sub>2</sub> 0,2 mM.

La inactivación térmica simultanea de suspensiones de este derivado en diferentes concentraciones manifiesta en ausencia de iones (Figura III.11 A) mayor velocidad de inactivación cuanto mayor es la dilución de la enzima en el medio; si se encuentra presente  $Mg^{2+}$  en el medio (Figura III.11 B) el efecto de la dilución no varía en relación a la estabilidad, favoreciéndose la desestabilización al bajar la concentración de enzima incubada; la presencia de  $Mn^{2+}$ , con (Figura III.11 C) o sin  $Mg^{2+}$  (Figura II.11 D), logra hacer independiente la estabilidad de la dilución a la que se encuentre la enzima, además de conferir estabilidad adicional al derivado.

Si se comparan los resultados de estabilidad del derivado glioxil-agarosa-75 (Figura III.11) con el comportamiento de la enzima soluble (Figura III.5) o de la enzima inmovilizada a través de una de sus subunidades (derivado  $\beta$ -gal-glutaraldehído-agarosa-3) (Figura III.6), se deduce que la inmovilización multipuntual sobre el soporte glioxil-agarosa-75 ha reducido enormemente la inactivación provocada por la dilución, si bien para anular dicho mecanismo de inactivación será necesaria la presencia exclusiva de  $Mn^{2+}$ , el cual además confiere estabilización adicional al derivado enzimático; en el derivado  $\beta$ -gal-glutaraldehído-agarosa-75 la presencia de cualquiera de los cationes divalentes estudiados ( $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ) es capaz de evitar el efecto de la dilución, siendo el ion  $Mn^{2+}$  el que provoca la estabilización adicional

### 1.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DERIVADOS ENZIMATICOS OBTENIDOS. DISCUSION

Se han realizado termoinactivaciones de los tres derivados enzimáticos preparados a baja concentración, con el fin de comparar la estabilidad en condiciones en las que se encuentran favorecidos todos aquellos procesos de inactivación dependientes de la concentración. La figura III.12 A muestra que la estabilización se logra sólo cuando la inmovilización de las moléculas de enzima ha tenido lugar por enlaces en los que participan ambas subunidades, es decir en los dos derivados multipuntuales.



**Figura III.12.** Inactivación térmica de  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* en tampón fosfato potásico 20 mM de pH 7,0 conteniendo  $MgCl_2$  2 mM y KCl 0,1 M a 45°C: soluble (□), inmovilizada sobre gel glutaraldehído-agarosa-3 (○), inmovilizada sobre gel glutaraldehído-agarosa-75 (■) e inmovilizada sobre gel glioxil-agarosa-75 (●). (A) a baja concentración de enzima: 27-46 U/ml (B) a alta concentración de enzima (0,07-0,16 U/ml).



En condiciones en las que los fenómenos de disociación no se encuentren favorecidos, es decir cuando en las suspensiones de los derivados enzimáticos incubados la concentración de enzima es alta (Figura III.12 B) solamente la unión multipuntual al soporte glioxil-agarosa permite la estabilización.

A la vista de los resultados de la inactivación, parece ser que la inmovilización sobre el soporte glioxil-agarosa-75 no sólo limita la inactivación por dilución al evitar la disociación de las subunidades de la molécula de enzima, como se mostraba en la figura III.12 A, sino que además logra estabilizaciones adicionales independientes de la dichos procesos. El tipo de activación de éste último soporte ha permitido la formación de un mayor número de enlaces entre cada subunidad y el soporte lo cual ha dotado al dímero de una estructura 3D más rígida y por lo tanto más resistente a posibles distorsiones que provocarían su inactivación térmica.

Respecto a la influencia de la inmovilización multipuntual sobre el efecto de la presencia de cationes covalentes, se observa que:

- el  $Mg^{2+}$  es capaz de evitar la inactivación por dilución cuando se trata del derivado  $\beta$ -gal-glutaraldehído-agarosa-75, sin embargo no ejerce ningún efecto sobre el derivado  $\beta$ -gal-glioxil-agarosa-75. Probablemente la mayor multiinteracción enzima-soporte en el último derivado citado ha afectado de algún modo al centro de unión correspondiente a éste catión quedando impedida su entrada y por lo tanto a su colaboración en el mantenimiento de la estructura cuaternaria correcta del dímero.

- la acción del catión  $Mn^{2+}$ , por el contrario, no se vé afectada por el diferente grado de multiinteracción entre los derivados pues en ambos casos protege de la pérdida de la estructura cuaternaria y alarga la semivida de la enzima en ausencia de procesos de disociación de subunidades.

## 2. $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Escherichia coli*

La inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* persigue como primer objetivo la unión simultánea de sus cuatro protómeros. La acometida del proceso ha de cumplir dos requisitos interrelacionados: conferir a la molécula la **orientación adecuada** y permitir **multiinteracción**. Para que al menos en cada subunidad tenga lugar la formación de una enlace con el soporte este ha de poseer el tipo de grupo reactivo capaz de conferir a la

molécula de enzima la disposición espacial óptima para que sus subunidades sean capaces de interactuar con él, para ello la densidad de grupos reactivos sobre el soporte ha de ser suficiente y las condiciones de la reacción ha de favorecer la interacción.

El conseguir la estabilización de la estructura cuaternaria con la inmovilización de la enzima oligomérica por unión covalente, permitirá el desarrollo, sobre los derivados enzimáticos obtenidos, de estudios posteriores orientados al incremento de la estabilidad de la enzima como catalizador; analizar los factores que intervienen en los diferentes mecanismos de inactivación y aplicar métodos adecuados a cada caso o desarrollar nuevos procedimientos de estabilización.

## 2.1. INMOVILIZACION MULTIPUNTUAL SOBRE DIFERENTES SOPORTES

Se han aplicado las diferentes estrategias disponibles para la inmovilización por unión covalente de enzimas a un soporte. Se han empleado soportes con diferentes grupos reactivos y activados al máximo. A los *soportes glioxil-agarosa* la enzima se unirá por su zona más rica en *Lys*, a los *geles MANA-agarosa* lo hará a través de la zona más rica en grupos *carboxilo* (*Asp* o *Glu*), y por grupos *amino de bajo pK* como el amino terminal tendrá lugar la unión a los soportes activados con *glutaraldehído*. En condiciones de reacción propicias para la interacción intensa, se han preparado derivados enzimáticos con el propósito de evaluar cada una de las orientaciones adoptadas por la enzima en cuanto a su capacidad para estabilizar la estructura cuaternaria de esta enzima tetramérica.

### 2.1.1. INMOVILIZACION SOBRE SOPORTE GLIOXIL-AGAROSA-75

La insolubilización es muy rápida, en 30 minutos queda en el sobrenatante el 8% de la enzima ofrecida (1 mg/ml gel), conservándose toda la actividad de la fracción de enzima inmovilizada. Sin embargo se mantiene la incubación en las mismas condiciones durante 20 horas con la intención de favorecer la multiinteracción enzima-soporte y, en consecuencia, la participación del mayor número de subunidades que permita la orientación conferida por el método. Transcurrido dicho tiempo la actividad remanente de la enzima inmovilizada es del 31%, lo cual indica que las condiciones de la

DERIVADO	Actividad <sub>remanante</sub> (a)	Disociación de subunidades (b)
glioxil-agarosa-75	31	+++
MANA-agarosa-75	64	-
glutaraldehído-agarosa-75	100	+

(a) Actividad enzimática que conserva la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* despues del proceso de inmovilización sobre diferentes soportes de agarosa.

(b) Valoración de la aparición de la banda correspondiente a 100.000 D. en la electroforesis de los sobrenadantes de los diferentes derivados enzimáticos incubados en condiciones favorables para la disociación de subunidades.

**Tabla III.1.** Derivados de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*.

Según se recoge en la tabla III.1 la inmovilización de la oligoenzima través de sus residuos de *Lys* (derivado glioxil-agarosa-75) no permite la unión al soporte de sus cuatro protómeros pues por electroforesis se observa la aparición de la banda de proteína correspondiente 100.000 D, banda identificada como la correspondiente al monómero (85). Cuando la inmovilización tuvo lugar sobre el soporte MANA-agarosa-75 por reacción a través de los carboxilos de la cadena polipeptídica, no se aprecia proteína liberada del soporte. El derivado glutaraldehído-agarosa-75 permite la disociación de una pequeña fracción de proteína.

Estos resultados indican que la orientación conferida por inmovilización al soporte MANA-agarosa-75 es la única que ha permitido una unión al soporte de gran intensidad y en la que participan sus cuatro subunidades, pues la incubación del derivado en condiciones altamente disociantes (*SDS* y  $\beta$ -mercaptoetanol), previa a la electroforesis no es capaz de liberar al sobrenadante cantidad apreciable de proteína.

Cuando el tetrámero se orienta en relación al soporte por su zona más rica en *Lys* la enzima mostró una importante caída de actividad atribuible a la intensidad de la interacción ya que el proceso se ha llevado a cabo bajo condiciones de alta reactividad, sin embargo en la unión no se han visto involucradas todas sus subunidades y por ello la electroforesis muestra una importante banda proteica. En el derivado preparado sobre gel glutaraldehído-agarosa-75, si bien también permite la liberación de proteína, según la intensidad de la banda registrada en la electroforesis, la cantidad de subunidades no

unidas al soporte parece menor que en caso anterior, además la actividad enzimática remanente es del 100%. En resumen: cuando el tetramero se orienta con respecto al soporte por su zona más rica en *Lys* no se ven involucradas sus cuatro subunidades y pierde un 70% de su actividad; sin embargo si la inmovilización de la enzima está dirigida a la reacción a través de sus aminos terminales no afecta a la actividad enzimática llegando a participar un mayor número de subunidades por molécula.

Estas hipótesis surgidas de los resultados obtenidos por electroforesis, se ven afianzadas si se analiza la estructura tridimensional reportada, los protómeros se disponen en un plano a lo largo de dos ejes de simetría perpendiculares, interaccionando dos-a-dos por sus caras idénticas (ver Figura III.4), así las dos superficies planas que ofrece el tetrámero al medio son idénticas y en él los protómeros opuestos ofrecen su misma zona, la cara contraria a la que ofrecen los protómeros situados en los otros dos opuestos (86). Si se supone que estas dos caras de cada subunidad o protómero no poseen la misma densidad en grupos reactivos (p.e. *Lys*), dos subunidades podrán interaccionar intensamente con el soporte mientras las otras dos no, pues su cara reactiva se encontraría del otro lado del tetrámero. Esto podría ser lo que sucede en el *derivado multipuntual glioxil-agarosa*, pues además se sabe que de los 1023 aminoácidos que componen el monómero de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, sólo 20 corresponden a *Lys*, lo cual indica su baja densidad superficial en una cadena polipéptidica tan voluminosa. Por otro lado, el extremo amino terminal de cada subunidad se encuentra en lo que en el tetrámero corresponde a dos vértices opuestos muy próximos cada dos monómeros, lo cual indica que será posible la interacción de los cuatro residuos con el soporte siempre que las condiciones de incubación favorecieran la reactividad de los grupos. Así en el *derivado glutaraldehído-agarosa-75* podrían haber participado tres o las cuatro subunidades en una gran parte de las moléculas inmovilizadas.

Sobre los derivados en los que la inmovilización no ha conseguido la estabilización de la estructura cuaternaria de la enzima, se ha propuesto el desarrollo de estrategias complementarias como el entrecruzamiento, que permitan la formación de puentes enlaces covalente entre las subunidades no unidas al soporte y las que ya se encuentran interaccionando con él dentro de la misma molécula.

## 2.2. ENTRECRUZAMIENTO CON AGENTES POLIFUNCIONALES DE ENZIMAS OLIGOMERICAS

Se ha estudiado la aplicación de estrategias de entrecruzamiento como herramienta de estabilización de la estructura cuaternaria de derivados enzimáticos inmovilizados en los que la orientación conferida a la molécula no ha permitido la unión simultánea de todas sus subunidades al soporte. Los agentes entrecruzantes utilizados se han generado a partir de moléculas de dextrano de diferente peso molecular: polímeros polialdehídicos o polímeros poliamínicos.

El estudio se ha desarrollado sobre un derivado inmovilizado a *gel glutaraldehído-agarosa-75* por dos motivos: en primer lugar, porque ser uno de los métodos que no permite la unión simultánea de todas las subunidades y, en segundo lugar, porque el proceso de inmovilización no supone pérdidas de actividad para la enzima lo cual es importante si se tiene en cuenta que la reacción con el agente entrecruzante supone la modificación química de la enzima y podría afectar a su actividad enzimática.

### 2.2.1. ENTRECRUZAMIENTO SOBRE UN DERIVADO UNIPUNTUAL

#### ► Inmovilización *unipuntual* sobre soporte glutaraldehído-agarosa

Se ha utilizado un soporte activado con 3  $\mu$ moles de grupos reactivos por ml de gel. La inmovilización ha tenido lugar en las mismas condiciones que se preparó el derivado multipuntual (*glutaraldehído-agarosa-75*) con el fin de no modificar la orientación preferente de la molécula en relación al soporte, marcada por la reactividad de los grupos de la proteína en esas condiciones. El resultado es la inmovilización de menor cantidad de enzima pues sólo se ha insolubilizado el 50% de la enzima ofrecida (1 mg/ml) y el mantenimiento de toda su actividad enzimática. La electroforesis realizada del sobrendante de una suspensión de este derivado incubado en SDS y mercaptoetanol ha dado como resultado la aparición de una banda más intensa que la del derivado multipuntual correspondiente al protómero.

## ► Entrecruzamiento con polímeros polialdehídicos

Se ha estudiado la influencia, sobre la eficacia del entrecruzamiento, de factores como el tamaño del polímero y el tiempo de reacción. Se han utilizado polímeros de diferentes pesos moleculares: 6.000, 18.300 y 87.000 y los tiempos de reacción transcurridos han sido entre 3,5 horas y 6 días. En todos los casos se han ofrecido para el proceso 20 moles de polímero por mol de enzima inmovilizada, basándose en experimentos realizados sobre otras enzima oligoméricas que mostraron buenos resultados (40). En la tabla III.2 se recogen las condiciones en la que transcurrieron las diferentes reacciones, el efecto sobre la actividad enzimática inmovilizada y los resultados obtenidos en relación con la electroforesis.

Condiciones reacción		Act. <sub>remanente</sub> (c)	Disociación de subunidades (d)
PM <sub>polímero</sub> (a)	tiempo (b)		
---	---	100	++++
6.000	3,5	100	++++
87.000	3,5	94	++++
6.000	46	86	++++
87.000	46	71	+++
18.300	144	46	++
87.000	144	35	++

(a) Peso molecular (D) del dextrano comercial a partir del cual se preparó el polímero.

(b) Duración de la incubación (horas) del derivado inmovilizado suspendido en la solución de polímero en las condiciones especificadas en Métodos.

(c) Porcentaje de actividad enzimática remanente del derivado inmovilizado una vez finalizada la incubación y reducidos los posibles enlaces formados.

(d) Valoración de la aparición de la banda correspondiente a 100.000 D. obtenidas por electroforesis según se especifica en Métodos.

**Tabla III.2.** Modificación química con polímeros polialdehídicos del derivado de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* inmovilizada covalentemente sobre soporte glutaraldehído agarosa-3. Influencia de la concentración de polímero y de la duración de la reacción.

Han sido necesarios tiempos de interacción muy largos (varios días de incubación) para conseguir que la electroforesis refleje una pequeña disminución la disociación de subunidades en los derivados modificados. Los tratamientos que han dado lugar a esa estabilización parcial de la estructura cuaternaria del derivado unipuntual han supuesto pérdidas de actividad enzimática, mayores cuanto mayor es el tiempo de interacción y el tamaño del polímero utilizado, lo cual indica la mayor modificación química de la enzima.

#### ► Entrecruzamiento con polímeros poliamínicos

Se ha estudiado la influencia, sobre la eficacia del entrecruzamiento, de factores como el tamaño del polímero, la concentración de CDI, y la temperatura de la reacción. En todos los casos se han ofrecido para el proceso 10 moles de polímero por mol de enzima inmovilizada, basándose en experimentos realizados sobre otras enzima oligoméricas que mostraron buenos resultados (40). En la tabla III.3 se recogen las condiciones en la que transcurrieron las diferentes reacciones, el efecto del proceso sobre la actividad de la enzima inmovilizada y los resultados obtenidos en la electroforesis.

Los derivados incubados en presencia de los polímeros poliamínicos con una concentración de CDI de  $1 \cdot 10^{-1}$  M no permiten que en condiciones altamente disociantes se pueda detectar (por electroforesis) liberación de proteína del soporte, sin embargo, la modificación química de la enzima ha sido tan intensa que ha perdido su actividad catalítica. El descenso de la concentración de CDI en el medio de reacción da lugar a derivados con mayor actividad remanente pero en los que ya no se estabiliza la estructura cuaternaria, aunque la fracción proteica liberada y registrada por electroforesis es menor que la que se aprecia en el derivado que no ha interaccionado con el polímero.

La menor concentración de CDI utilizada,  $1 \cdot 10^{-2}$  M, ha permitido la obtención de derivados modificados conservando el 100% y el 55-65% de su actividad enzimática, según se haya realizado el entrecruzamiento con un polímero de 6.000 o de 87.000 daltones. El efecto del tamaño del polímero poliamínico sobre la actividad remanente del derivado podría ser el reflejo de distorsiones de la enzima provocadas por interacciones más numerosas cuando la cadena de agente entrecruzante es larga.

Condiciones de reacción			Act. <sub>reman</sub> (d)	Disociación de subunidades (e)
PM <sub>polimero</sub> (a)	CDI (b)	Temperatura(c)		
---	---	---	100	++++
6.000	1.10 <sup>-1</sup>	TA	2	-
	5.10 <sup>-2</sup>	TA	8	+
	3.10 <sup>-2</sup>	TA	31	+
	3(10 <sup>-2</sup> )	TA	36	++
	1.10 <sup>-2</sup>	TA	100	++
87.000	1.10 <sup>-1</sup>	TA	3	-
	1.10 <sup>-2</sup>	TA	55	++
	1.10 <sup>-2</sup>	F	65	++

(a) Peso molecular (Daltones) del dextrano comercial a partir del cual se preparó el polímero.

(b) Concentración (M) de CDI en el medio de incubación.

(c) Temperatura (°C) a la que transcurrió la incubación. TA: Temperatura ambiente (18-20°C), F: Frío (4°C).

(d) Porcentaje de actividad enzimática remanente del derivado inmovilizado una vez finalizada la incubación y reducidos los posibles enlaces formados.

(e) Valoración cualitativa de la banda correspondiente a 100.000 D. obtenidas por electroforesis según se especifica en Métodos.

**Tabla III.3.** Modificación química con polímeros poliamínicos del derivado de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* inmovilizada covalentemente sobre soporte glutaraldehído agarosa-3. Influencia de la concentración de polímero, de la concentración de CDI en la reacción y de la duración de la incubación.

### 2.2.2. ENTRECRUZAMIENTO SOBRE UN DERIVADO MULTIPUNTUAL

Basándose en el estudio de los diferentes factores que influyen en la eficacia del entrecruzamiento sobre el derivado unipuntual, se han elegido las condiciones que podrían ser más apropiadas y se han aplicado al derivado multipuntual obtenido por inmovilización sobre el mismo soporte (gel glutaraldehído-agarosa) que, según se había comprobado por electroforesis tampoco presenta unidas al soporte sus cuatro subunidades.



**► Entrecruzamiento con polímeros polialdehídicos**

Se ha utilizado el polímero de 87.000 D, ofreciéndose 20 moles por mol de enzima inmovilizada y se ha incubado en presencia del soporte durante 6 días (~144 horas). El derivado modificado resultante conservó el 67% de su actividad, lo cual supone una inactivación mucho menor con respecto a la sufrida por el derivado unipuntual después del mismo tratamiento. La electroforesis no permite apreciar la aparición de la banda correspondiente al protómero, lo que significa que el tratamiento ha conseguido enlazar intramolecularmente las subunidades que no se encontraban unidas al soporte a las que si formaban enlace covalente con él.

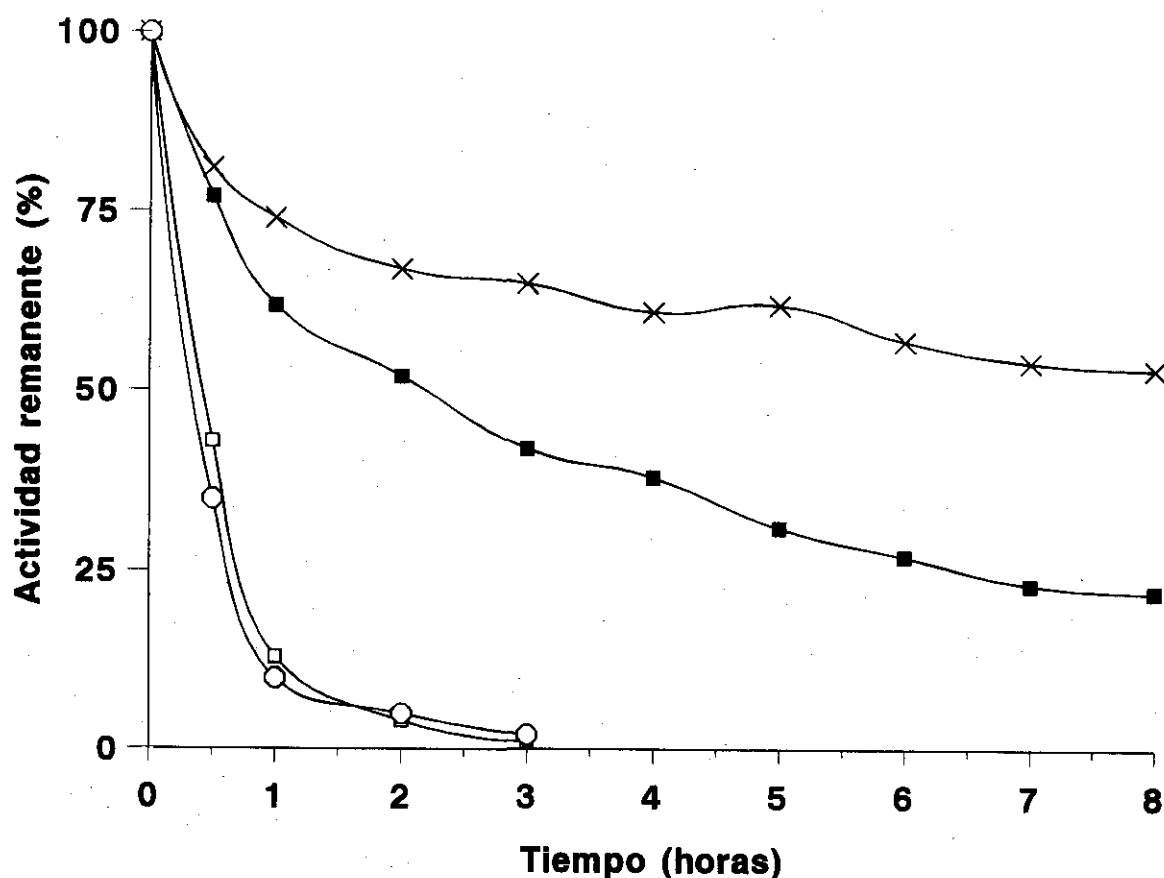
**► Entrecruzamiento con polímeros poliamínicos**

El derivado se ha hecho reaccionar con el polímero de 6.000 daltones en un medio con CDI  $5 \cdot 10^{-2}$  M (TA) y con el polímero de 87.000 en un medio con CDI  $3 \cdot 10^{-2}$  M (TA). Los derivados modificados, obtenidos después de los citados tratamientos, al ser incubados en SDS y mercaptoetanol no permiten la disociación de subunidades. El primero de los tratamientos dió lugar a un derivado con el 24% de actividad enzimática remanente, mientras que el segundo conservó el 32%.

**2.3. TERMOESTABILIDAD DE LOS DIFERENTES DERIVADOS INMOVILIZADOS**

En la figura III.13 se muestran los cursos de inactivación obtenidos con diferentes derivados de esta enzima oligomérica y se han comparado con la estabilidad de la enzima en solución a la misma concentración.

Se ha realizado la incubación a 44°C de tres derivados enzimáticos preparados por inmovilización sobre un mismo tipo de soporte cuyo grupo reactivo condiciona la orientación de la molécula. La diferencia entre ellos se encuentra en el número de subunidades que se encuentran unidas covalentemente directa o indirectamente al soporte sin posibilidad de disociarse del resto del tetramero para diluirse en el medio de incubación.



**Figura III.13.** Inactivaciones térmicas de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* soluble ( $\square$ ) y de tres derivados inmovilizado de ella: derivado glutaraldehído-agarosa-3 o Ec-1 ( $\circ$ ), derivado glutaraldehído-agarosa-75 o Ec-2 ( $\blacksquare$ ) y derivado glutaraldehído-agarosa estabilizado por modificación con moléculas polialdehídicas o Ec-3 ( $\times$ ).

- En el derivado Ec-1 la enzima debe estar inmovilizada covalentemente a través de una de sus cuatro subunidades pues la baja densidad de grupos reactivos de soporte obtenido y la escasez de residuos proteicos con reactividad suficiente para interaccionar con ellos no permitiría la formación de más enlaces. Por electroforesis se comprobó disociación de una fracción importante de protómero.
- El derivado Ec-2 debe tener una gran parte de la moléculas inmovilizadas por dos o más subunidades pues el soporte posee gran cantidad de grupos reactivos y superficiales lo cual favorece la participación de varios grupos y por lo tanto

de varias subunidades de la misma molécula, por eso no permite la disociación.

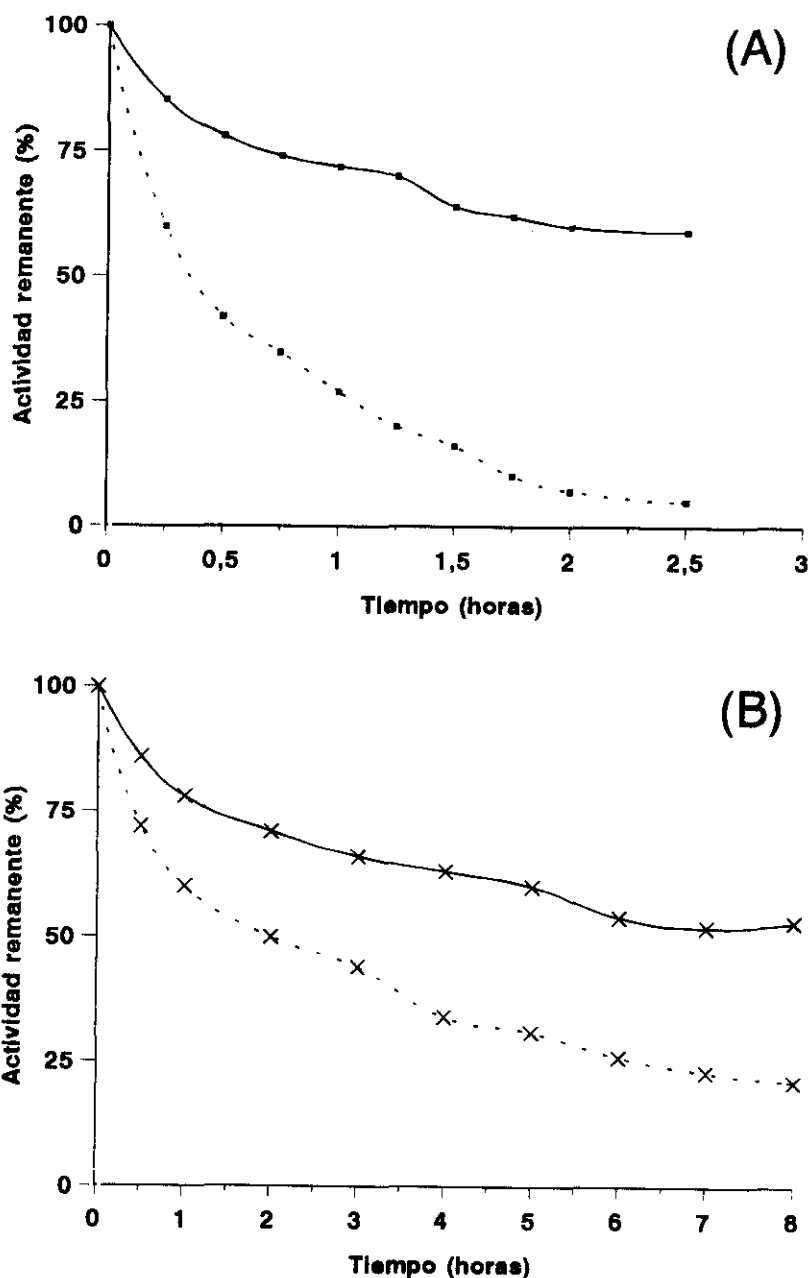
- El derivado Ec-3, que mantiene las cuatro subunidades de la enzima inmovilizadas unas directamente al soporte y las otras unidas a las primeras por entrecruzamiento con moléculas polialdehídicas, es unas 20 veces más estable que el derivado unipuntual o que la enzima en solución, consecuencia de la estabilización de su estructura cuaternaria.

\* \* \*

Dos de los derivados glutaraldehído-agarosa-75 con la estructura cuaternaria estabilizada por entrecruzamiento se incubaron a diferentes concentraciones a 44°C. Paralelamente se realizó la incubación de la enzima en solución en las mismas condiciones. Las figura III.14 A y B se recogen los cursos de inactivación correspondientes a estas incubaciones en dos concentraciones diferentes.

En ellas se observa que la dilución de la enzima 10 veces provoca su desestabilización en un medio a pH óptimo de actividad, tanto si esta se encuentra libre en solución como si sus moléculas se han inmovilizado y todas sus subunidades se han unido entre sí.

Los derivados modificados muestran diferentes velocidades de inactivación según la concentración a la que se encuentre la enzima en el medio, sin embargo se ha conproado que el proceso de estabilización desarrollado hasta obtener dichos derivado no permite que se produzcan los fenomenos de disociación de subunidades relacionados con la dilución de la enzima en el medio de reacción. Esto hace suponer que en el sistema enzimático está teniendo lugar algún otro proceso relacionado con la dilución del derivado en el medio; algún otro proceso cuyo mecanismo se base en la modificación de las concentraciones de especies activas y no activas relacionadas través de un equilibrio de asociación-disociación.



**Figura III.14.** Inactivaciones térmicas en dos concentraciones diferentes de (A) la enzima soluble y (B) del derivado glutaraldehído-agarosa-75, incubados en tampón fosfato 20 mM, KCL 0,1 M de pH 7,0 a 45°C: solución concentrada (—) y solución diluida (---).

Si se tiene en cuenta los variados resultados obtenidos en reacción a la influencia de determinados cationes en la actividad enzimática, en su actividad optima, así como el diferente efecto que manifiestan sobre cada sustrato y al variar las condiciones del medio, podría ser la presencia o ausencia de alguno de ellos la causante de la pérdida

de actividad o de su menor estabilidad. Estos átomos pueden tanto jugar un papel importante dentro del mecanismo catalítico de la enzima como desarrollar una determinada función estructural en la molécula. La interacción de estos cationes con la cadena polipeptídica es de tipo iónico y por ello el grado de ionización de determinados grupos de la proteína y todo lo que pueda afectar a dicha asociación, influirá en mayor o menor medida en su eficiencia.

El estudio de esta enzima queda abierto a la investigación de la posible influencia de determinados cationes sobre su actividad y estabilidad en los derivados enzimáticos, especialmente del  $Mg^{2+}$ .

### 3. DISCUSION

Se han estudiado la posibilidad de inmovilización y estabilización de la estructura cuaternaria de dos enzimas oligoméricas, las  $\beta$ -galactosidasas de *K. lactis* y de *E. coli*.

Con respecto a la primera, no ha resultado difícil la inmovilización covalente simultánea a través de las dos subunidades que la componen, el éxito del proceso depende llevar a cabo el proceso en unas condiciones que permitan la multiinteracción enzima soporte para favorecer la participación de residuos pertenecientes a las dos subunidades. En este caso particular ha sido suficiente con la utilización de un soporte con alta densidad de grupos reactivos, sin ser necesario extremar las condiciones del medio de incubación para aumentar la reactividad de los grupos. Para ello se han utilizado dos soportes: gel glutaraldehído-agarosa que interacciona esencialmente con el residuo amino terminal de la cadena polipeptídica, y el gel glioxil-agarosa que interaccionará con los residuos *Lys* superficiales de la misma.

Una vez comprobada la estabilización la estructura cuaternaria en cuanto a evitar los fenómenos de disociación de subunidades en el medio de reacción, se ha visto que ello supone la estabilización térmica de la enzima cuando esta es diluida. En concentraciones en las cuales la disociación no está favorecida la simple inmovilización de las dos subunidades (derivado glutaraldehído-agarosa-75) no es suficiente para mostrar estabilizaciones térmicas, siendo necesaria una inmovilización más intensa como la lograda en el derivado glioxil-agarosa-75, probablemente porque permite la formación de mayor cantidad de enlaces en cada subunidad lo cual confiere rigidez a su estructura terciaria.

Por otro lado, se ha estudiado el efecto de los cationes  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  sobre los diferentes derivados enzimáticos obtenidos y los resultados obtenidos ha permitido establecer hipótesis sobre el papel que pueden tener en la estabilidad de la enzima. En la enzima en solución ambos cationes actúan estabilizando la estructura cuaternaria pues reducen las diferencias de estabilidad causadas por la dilución de la solución enzimática. Cuando la enzima se encuentra inmovilizada a través de sus dos subunidades la presencia de estos cationes no sólo permite eliminar el efecto de la dilución, sino que confieren estabilización adicional.

En cuanto a la segunda de las enzimas estudiadas, la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* es una enzima mucho más compleja y su estudio todavía necesita ser ampliado pues los resultados obtenidos son muy interesantes. A pesar de tratarse de una enzima tetramérica, la disposición más o menos en un plano de sus protómeros ha permitido la estabilización de su estructura cuaternaria siguiendo dos estrategias: la inmovilización multi-subunidades a un soporte MANA-agarosa y la inmovilización parcial a un soporte glutaraldehído-agarosa que ha sido finalmente completada con el desarrollo de estrategias adicionales de entrecruzamiento intramolecular con moléculas poliamínicas o polialdehídicas. La unión de sus cuatro subunidades por cualquiera de los dos métodos ha permitido la estabilización térmica de los derivados incubados a altas concentraciones. Sin embargo, si bien los fenómenos de disociación de subunidades han sido impedidos por la inmovilización de todas ellas al soporte, esto no se refleja en la prolongación de las semividas de los derivados incubados diluidos. Por eso se ha pensado en que algún otro mecanismo de inactivación favorecido por la dilución de la enzima que no ha sido reducido por la estabilización de la estructura cuaternaria continúe siendo el responsable del proceso, como por ejemplo la disociación de algún catión imprescindible para la actividad.

Utilizando dos tipos de polímeros polireactivos se ha conseguido el entrecruzamiento intersubunidades de un enzima tetramérica que previamente se había inmovilizado por unión covalente unipuntual. Esto supone disponer de una importante estrategia de estabilización de la estructura cuaternaria de cualquier proteína oligomérica que no pueda ser inmovilizada por unión simultánea de todas sus subunidades al soporte. A nivel industria el conseguir derivados inmovilizados de enzimas oligoméricas en los que no tenga lugar la disociación de sus subunidades consecuencia de la dilución del catalizador durante los largos y numerosos ciclos de reacción, será de gran importancia por evitarse la contaminación de la mezcla de reacción con el catalizador y la

consecuente inactivación.

Es importante señalar que el proceso de entrecruzamiento supone la modificación química de la enzima. Esta modificación química puede afectar a su actividad enzimática por lo que es importante el control de la reacción y de las variables que influyen en su rendimiento y que dependerán de la enzima sobre la que se desarrolle el método. Para la optimización de las condiciones se ha de llegar a un compromiso entre la efectividad del entrecruzamiento y su efecto sobre la actividad catalítica de la enzima.

En general, para el abordaje de la inmovilización y estabilización de cualquier enzima hay que tener en cuenta que la complejidad de la molécula proteica hace necesario ampliar los estudios sobre todos los variados procesos que en diferente medida afectan a su actividad y a su estabilidad.

\* \* \*

## **DISCUSION GLOBAL Y CONCLUSIONES**



## DISCUSION GLOBAL Y CONCLUSIONES

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se han desarrollado diferentes estrategias de Ingeniería Bioquímica para resolver los problemas asociados al *diseño molecular de derivados de renina y lactasas* útiles para la hidrólisis de caseína  $\kappa$  y lactosa en leche. Dado que dichos problemas son similares a los de otros sistemas enzimáticos de interés en química orgánica, química analítica e, incluso, en tecnología de otros alimentos, se han desarrollado *técnicas bioquímico-físicas* de modificación de enzimas que, en principio, pudieran también ser válidas para otros procesos enzimáticos o para procesos cromatográficos en los que se emplean proteínas y otras macromoléculas como ligandos. Estas técnicas se pueden agrupar en:

- Inmovilización orientada de enzimas utilizando diferentes áreas de su superficie en el proceso de unión covalente al soporte.
- Utilización de sólidos porosos con diferente morfología interna como soportes para la inmovilización de enzimas.
- Utilización de brazos espaciadores grandes, inertes, hidrofílicos y flexibles para optimizar la interacción entre la molécula de enzima inmovilizada y el sustrato, cuando éste sea macromolecular y por lo tanto presente mayores condicionantes estéricos a la interacción con la enzima.
- Utilización de moléculas tipo *dextrano* como agentes espaciadores o como agentes entrecruzantes.
- Utilización de las cadenas de carbohidratos de enzimas glicosiladas como brazos espaciadores o como agentes entrecruzantes intrínsecos.
- Modificación química previa de la enzima para optimizar las diferentes estrategias de inmovilización o de entrecruzamiento. Lo cual permite simular los

resultados que por vías genéticas se obtendrían de un modo dirigido y controlado, al enriquecer en un determinado grupo la zona de la enzima que interese para posteriores reacciones de inmovilización o de entrecruzamiento.

La aplicación coordinada de las diferentes técnicas de inmovilización ha conducido a resultados muy importantes. Así:

- se han obtenido derivados de renina de *Mucor miehei* que conservan después de la inmovilización el 33% de su actividad caseinolítica. Estos resultados son realmente espectaculares si se comparan con los datos de la literatura científica donde la renina inmovilizada apenas mostraba un 1% de esta actividad coagulante con respecto a la enzima soluble.
- la combinación de un proceso de aminación controlada de la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y el diseño del proceso de unión multipuntual y del entrecruzamiento posterior con su propias cadenas glicosídicas ha permitido estabilizaciones de 600 veces con respecto a la enzima soluble aminada y de más de 20 veces respecto a la enzima nativa.
- con la estabilización conjunta de la estructura cuaternaria y de la estructura terciaria que se ha logrado por inmovilización multipuntual de la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* sobre geles de agarosa se ha aumentado su estabilidad térmica más de 10 veces en relación a la enzima nativa.

\* \* \*

Entre los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral se resaltan previamente las siguientes conclusiones:

1. Tomando como enzimas modelo, cuatro enzimas de interés en la industria láctea, se han desarrollado una serie de metodologías de Ingeniería Enzimática sobre la base de la tecnología bioquímico-física en fase sólida para la obtención de derivados inmovilizados, reutilizables por lo tanto, abordando tres importantes condicionantes o limitaciones surgidas de la complejidad de los catalizadores enzimáticos, como lo son: las enzimas que actúan sobre sustratos macromoleculares, las enzimas glicosidadas y la

enzimas oligoméricas.

2. Diseñando cuidadosamente el proceso de inmovilización se han preparado derivados de renina de *Mucor miehei* que conservan en todos los casos el 100% de su actividad catalítica hacia el sustrato sintético de bajo peso molecular, utilizando soportes con diferentes estructura interna, diseñando procesos de inmovilización a través de diferentes áreas de la enzima e interponiendo diferentes tipos de brazos espaciadores entre los grupos activos que reaccionan con la enzima y el soporte sobre el cual están situados. Todos estos parámetros: lamorfología del soporte, el tipo de grupo activo y el brazo espaciador utilizado, resultaron decisivos par definir la accesibilidad de los sustratos macromoleculares hacia el centro activo de las moléculas de enzima inmovilizada. De este modo las actividades caseinolíticas de los diferentes derivados preparados varían en un margen muy amplio desde un 2% hasta un 33% de la actividad correspondiente a la enzima nativa que había sido inmovilizada.

3. Los mejores resultados, 100% de actividad hacia el hexapéptido sintético y 33% de actividad hacia la caseína  $\kappa$  se obtuvieron cuando la inmovilización de la renina de *M. miehei* tuvo lugar a través de sus cadenas de carbohidratos a soportes con estructura interna constituida por entramados de cadenas unimoleculares poliacrílicas. Esta combinación de un sólido que promueve pocos impedimentos estéricos y el brazo espaciador intrínseco que supone la presencia de las propias cadenas glicosídicas de esta glicoenzima ha permitido obtener una actividad caseinolítica con renina inmovilizada más de 10 veces superiores a las reportadas hasta ahora en la literatura científica.

4. La  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* está también altamente glicosilada y, a pesar de ello, se ha inmovilizado, probablemente a través de una unión "bipuntual", a geles glioxil-agarosa dando lugar a unos derivados que conservan un elevado porcentaje de actividad catalítica (un 75%) pero solamente dos veces más estables que la enzima nativa. La aminacion adicional de la enzima soluble, por reacción de sus residuos ácidos con etilendiamina, parece aumentar considerablemente las posibilidades de unión multipuntual enzima-soporte, dando lugar a derivados inmovilizados estabilizados más de 500 veces con respecto a la enzima soluble aminada.

5. Se ha desarrollado una estrategia original de estabilización de enzimas glicosiladas previamente inmovilizadas mediante entrecruzamiento intramolecular utilizando sus propias cadenas de carbohidratos como agentes entrecruzantes intrínsecos. La oxidación de estas cadenas da lugar a grupos aldehído que, incubados en las condiciones óptimas de temperatura, pH y tiempo, reaccionarán con residuos *Lys* o con los residuos ácidos modificados con etilendiamina que se encuentren en la superficie de la molécula de enzima situados en la proximidad de dichas cadenas glicosídicas.

6. Tanto la unión covalente multipuntual de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* sobre los soportes glioxil-agarosa como el posterior entrecruzamiento intramolecular utilizando sus propias cadenas glicosídicas provocan un aumento importante de la rigidez de dicha molécula, lo cual se traduce en estabilizaciones frente a condiciones inactivantes, como temperatura o pH. Sin embargo, para forzar estos procesos es preciso realizar dos modificaciones químicas de la enzima: la aminación de sus residuos ácidos y la oxidación de sus cadenas de carbohidratos. Estas modificaciones tienen efectos inactivantes *per se* de diferente naturaleza y según las condiciones de inactivación. Así mientras la estabilización de los derivados frente a la enzima aminada y oxidada era superior a 500 veces, la estabilización relativa a la enzima nativa depende considerablemente de los tratamientos realizados y de las condiciones de inactivación. Una elección cuidadosa de los métodos de modificación y de las estrategias de estabilización ha permitido estabilizar la enzima nativa más de 20 veces frente al efecto del calor a pH 7,0.

7. La  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* fue inmovilizada sobre soportes glioxil-agarosa y glutaraldehído-agarosa muy activados. En ambos casos se ha logrado estabilizar la estructura cuaternaria de la molécula de enzima ya que la inmovilización ha tenido lugar a través de sus dos subunidades. Dicha estabilización se reflejó en un importante aumento de la estabilidad térmica de los derivados enzimáticos. Mucho más espectaculares fueron los resultados obtenidos con los geles glioxil-agarosa, probablemente por haberse producido una interesante unión multipuntual involucrando a varios residuos *Lys* de cada una de las subunidades de la misma molécula.

8. Se desarrollaron diferentes estrategias para estabilizar la estructura cuaternaria de una proteína todavía más compleja, la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*. Ciertas inmovilizaciones involucrando la zona de la enzima más rica en residuos *carboxilo* produjeron la inmovilización de las cuatro subunidades. Sin embargo, la inmovilización con diferente orientación, a través de residuos de *Lys* o del grupo *amino terminal* no ocurrieron a través de todas las subunidades y se tuvo que recurrir al entrecruzamiento con macromoléculas polifuncionalizadas tipo *dextrano* como estrategia adicional de estabilización a desarrollar sobre los derivados ya inmovilizados que no tenían la estructura cuaternaria estabilizada. En este caso la estabilización de la estructura tetramérica de la enzima refleja también un interesante incremento de termoestabilidad.

\* \* \*

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Michaelis, L. y Menten, M.L. (1913). *Bioche. Z.*, 49,33.
2. Klivanov, A.M. (1979). Enzyme stabilization by immobilization. *Anal. Biochem.*, 93, 1-25.
3. Klivanov, A.M. (1983). Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advances in Applied Microbiology*, 29, 1-28.
4. Mozhaev, V.V., Siksnis, V.A., Torchilin, V.P. y Martinek, K. (1983). Operational stability of copolymerized enzymes at elevated temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 1937-1945.
5. Mozhaev, V.V., Sergeeva, M.V., Belova, A.B. y Khmelnitsky, Y.L. (1989). Multipoint attachment to a support protects enzyme from inactivation by inorganic solvents:  $\alpha$ -chymotrypsin in aqueous solutions of alcohols and diols. *Biotechnology and Bioengineering*, 35- 653-659.
6. Martinek, K., Klivanov, A.M., Goldmacher, V.S y Berezin, I.V. (1977). *Biochimica and Biophysica Acta*, 485, 1.
7. Guisán, J.M. (1988). Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 375-382.
8. Blanco, R.M., Calvete, J.J. y Guisán J.M. (1989). Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin(amine)-agarose(aldehyde) multipoint attachment. *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 353-359.

9. Otero, C., Ballesteros, A. y Guisán, J.M. (1988). Immobilization-stabilization of lipase from *Candida Rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 19, 163-175.
10. Guisán, J.M., Bastida, A., Cuesta, C., Fernández-Lafuente, R. y Rosell, C.M. (1991). Immobilization-stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde agarose gels. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 1144-1152.
11. Alvaro, G., Fernández-Lafuente, R., Blanco, R.M. y Guisán, J.M. (1990). Immobilization-stabilization of penicillin G acilase from *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 26, 181-195.
12. Bes, M.T., Gómez- Moreno, C., Guisán, J.M. y Fernández-Lafuente, R. (1995) "Selective oxidation: stabilization by multipoint attachment of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase, an interesting cofactor recycling enzyme. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 98, 161-169.
13. Mehaia, M.A. y Cheryan, M. (1983). Distribution of glyco- $\kappa$ -casein in bovine casein micelles: A study using soluble and immobilized proteases. *Journal of Dairy Science*, 66, 2472-2481.
14. Brule, G. y Lenoir, J. (1987) en *El queso* (Eck, A., ed.) Ediciones Omega, Barcelona.
15. Berridge, N.J. (1954). Rennin and the clotting of milk. *Advan. Enzymol.*, 15, 423-448.
16. Turk, R.S., Watkins, A.S. y Blair, G.T. (1990). Differential thermal inactivation analysis of calf rennets. *Journal of Dairy Science*, 73, 2000-2006.
17. Roed, B.L. (1991). Determination of the relative animal rennet composition when measured at two different pH values. *Milchwissenschaft*, 46, 31-32.
18. Green, M.L. (1977) Review of the progress of dairy science: milk coagulants. *Journal of Dairy Research*, 44, 159-188.
19. Delfour, A., Jollès, J. Lalis, C. y Jollès, P. (1965). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 452-455.



20. Sternberg, N.Z. (1971). Cristalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *Journal of Dairy Science*, 54, 159-167.
21. Raymond, M.-N., Bricas, E., Salesse, R., Garnier, J. Garnot, P. y Ribadeau Dumas, B. (1973). A proteolytic unit for chymosin (rennin) activity based on a reference synthetic peptide. *Journal of Dairy Science*, 56, 419-422.
22. Martin, P., Raymond, M.-N., Bricas, E. y Ribadeau Dumas, B. (1980). Kinetic studies on the action of *Mucor pullisus* and *Mucor miehei* acid proteases and chimosins A and B on a synthetic chromophoric hexapeptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 612, 410-420.
23. Fernández-Lafuente, R., Rosell, C.M., Rodríguez, V., Santana, M.C., Soler, G., Bastida, A. y Guisán, J.M. (1993). Preparation of activated supportas containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxil coupling method. *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 189-495.
24. Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V. Rosell, C.M. y Guisán, J.M., Activation of activated supportes with glutaraldehyde for proteina immobilization yield two dissimilar active groups with different reactivity and stability. (Manuscrito en preparación).
25. Martin, P., Collin, J.C., Garnot, P., Ribadeau Dumas, B. y Mocquot, G. (1981). Evaluation of bovine rennets in terms of absolute concentrastions of chymosin and pepsin A. *Journal of Dairy Research*, 48, 447-456.
26. Douillard, R., Ribadeau Dumas, B. (1970). Détermination avec la caséine  $\kappa$  de l'activité protéolytique de la presure de la pepsine de porc et des pepsines bovines. *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique*, 52, 1429-1445.
27. Schwert, G.W. y Takenaka, Y. (1955). *Biocim. and Biophys. Acta*, 6, 570-576.
28. Blanco, R.M. y Guisán, J.M. (1989). Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohidride reduction of tripsin-agarose derivatives. *Enzyme Microb. Technol*, 11, 360-366.

29. Visser, S., Rooijen, P.J. van, Shattenkerk, C. y Kerling, K.E.T. (1976). Peptide substrates for chymosin (rennin). Kinetic studies with peptides of different chain length including parts of the sequence 101-112 of bovine  $\kappa$ -casein. *Biochimica and Biophysica Acta*, 138, 265-272.
30. Raymond, M.-N., Garnier, J., Bricas, E., Cilianu, S., Blasnic, M., Chain, A. y Lefrancier, P. (1972). Studies on the specificity of chimosin (rennin). I. Kinetic parametres of the hydrolysis of synthetic oligopeptide substrates. *Biochimie*, 4, 145-154.
31. Penzol, G. (1992). Inmovilización de proteínas industriales que actúan sobre substratos macromoleculares. Hidrólisis de caseína por derivados de renina. Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.
32. Wong, S.S. (1993) en *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinkin*. CRC Press, Inc.
33. Schacht, E.H. (1987). Modification of dextran and application in prodrug design, en *Industrial polysaccharides: Genetic engineerig, structure/property relations and applications* (Yalpani, M. ed.) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
34. Drobchenko, S.N, Isaeva-Ivanova, L.S., Kleiner, A.R., Lomanki, A.V., Kolker, A.R. y Noskin, V.A. (1993). An investigation of the structure of periodate-oxidized dextran. *Carbohydrate Research*, 241, 189-199.
35. Georghean, K.F. Cabacungan, J.C. Dixon, H.B.F. y Feeney, R.E. (1981). Alternative reducing agents for reductive methylation of amino groups in proteins. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 17, 345-352.
36. Billman, J.H. y McDowell, J.W. (1961). Reduction of Schiff Bases. III. Reduction with dimethylamine borane. *Journal of Organic Chemistry*, 26, 1437-1440.
37. Zale, A. y Klivanov, A.M. (1983). Mechanisms of irreversible thermoinactivation of enzymes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 20-26.

38. Arakawa, T. y Timasheff, S.N. (1982). Stabilization of protein structure by sugar. *Biochemistry*, 21, 6536-6544.
39. Germain, P., Slagmolen, T. y Crichton, R.R. (1989). Relation between stabilization and rigidification of the three-dimensional structure of an enzyme. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 563-569.
40. Rodríguez, V. (1995). Estabilización de enzimas de estructura compleja: Biotransformación enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.
41. Barbaric, V., Mrsa, B., Ries, B. y Mildner, P. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.*, 234, 379.
42. Piesecki, S. y Alhadeff, A. (1992). *Biochem. Biophys. Acta*, 1119, 194.
43. Bonnaffe, D., Therisod, M., Seris, J.L. y Lubineau, A. (1992). Chemical deglycosilation of Horseradish peroxidase and surglycosylation using a new glycosilating reagent: effects on catalytic activity and stability, en *Stability and stabilitation of enzymes. Proceedings of an international symposium held in Maastrch, The Netherlands. W.J.J. van den Tweel, A. Harder and R.M. Buitelaar (Eds.)*.
44. Pazur, J.H., Knull, H.R. y Simpson, D.L. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40, 110.
45. Grace, M.E. y Grabowski, G.A. (1990). *Biochem. Biophys. RTes. CVommun.*, 168, 771.
46. Mozhaev, V.V., Melik-Nubarov, N.S., Siksnis, V. y Martinek, k. (1990). Strategy for chemical modification. *Biocatalysis*, 3, 189-196.
47. Turková, J., Vohnik, S. y Helusová, S. (1992). galactosilation as a tool for the stabilization and immobilization of proteins. *Journal of Cromatography*, 597, 19-27.
48. Hsiao, H.-Y. y Royer, G.P. (1979). Immobilization of glycoenzymes through carbohydrate side chains. *Archives of Biochemistry and Biophysica*, 198, 379-385.

49. Sleemunddin, M. y Husain, Q. (1991). Concavalin A: A useful ligand for glycoenzyme immobilization - a review. *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 290-295.
50. Cesi, B., Kozulic, B. y Barbaric, S. (1992). A process for estabilization of glycoproteins, en *Stability and Stabilitation of Enzymes. Proceedings of an International Symposium held in Maastrch, The Netherlands. W.J.J. van den Tweel, A. Harder and R.M. Buitelaar (Eds.)*.
51. Ogushi, S., Yoshimoto, T. y Tsuru, D. (1989). Purification and comparision of two tipos of  $\beta$ -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.*, 58, 115-122.
52. Tanaka, Y., Kagamishi, A., Kiuchi, A. y Horiuchi, T. (1975). Purification an properties of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biochemistry*, 77, 241-147.
53. Nakao, Y., Kozutsumi, Y., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Yamashina, I., Mutsaers, J.H.G.M., Van Halbeek, H. y Vliegenthart, J.F.G. (1987). Structures of oligosaccharides on  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem* 102, 171-179.
54. Park, Y.k., De Santi, M.S.S., Pastore, G.M. (1979). Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Science*, 77, 100-103.
55. Shukla, H. y Chaplin, M. (1993). *Enzyme Microb. Technol.*, 15 297-299.
56. van Griethuysen, E., Flashel, E. y Renken, A. (1985). The influence of the ion content of whey on the pH-activity profile of the  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J.Chem. Tech. Biotechnol.*, 35B, 129-138.
57. Sarto, V., Maerzetti, A. y Focher, B. (1985).  $\beta$ -D-galatosidases immobilized on soluble matrices: kinetics and stability. *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 515-520.
58. Dominguez E., Nilson, M. y Hahn-Hägerdal, B. (1988). Carbodiimide coupling of -galactosidase from *Aspergillus oryzae* to alginate. *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 606-610.

59. Dekker, R.F.H. (1889). Immobilization of a lactqase onto a magnetic support by covalent attachment to polyethyleneimine-glutaraldehyde-activated magnetite. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 22, 289-310.
60. Sorensen, J.E. y Emborg, C. (1989). Influence of immobilization technique on the quality of immobilized enzyme products based on a porous SiO<sub>2</sub> carrier. *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 26-28.
61. Peterson, R.S., Hill, C.G. y Amudson, C.H. (1989). Effects of temperature on the hydrolysis of lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase in a capillary bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 34, 429-437.
62. Bakken, A.P., Hill, C.G. y Amundson, C.H. m(1990). Use of novel immobilized  $\beta$ -galactosidase reactor to hidrolyze the lactse constituent of skim milk. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 293-309.
63. Prenosil, J.E., Stuker, E., Hediger, T. y Bourne, J.R. Enzymatic whey hydrolysis in a pilot plant "Lactohyd". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 136-139.
64. Hoare, D.G. y Koshland, D.E. (1967). A method for the quntitative modification and stimation of carboxilic acid groups in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 242,2447-2453.
65. Santana, M.C. (1991). Diseño de nuevas estrategias de inmovilización y estabilización de glicoproteinas. Aplicación a la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.
66. Naoi, M., Kiuchi, K., Sato, T., Tosa, T., Chibata, I. y Yagi, K. (1994). Alternation of the substrate specificity of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase by modification with polyethilene glycol. *Journal of Applied Biochemystry*, 6, 91-102.
67. Cuesta, C. (1994). Diseño de catalizadores enzimáticos para procesos de química fina: Síntesis de peptidos y ésteres por quimotripsina inmovilizada y modificada químicamente. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias.

68. Chan, W.W.-C. (1976). Immobilized subunits, en *Methods in Enzymology*, vol. XLIV, 491-503 Mosbach, K. ed.) Academic Press, New York.
69. Misset, O., Brower, M. y Robillard, G.T. (1980). *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Evidence that the dimer is the active form of Enzyme I. *Biochemistry*, 19, 883-890.
70. Ziegler, M.M., Goldberg, M.E., Chaffottes, A.F. y Baldwin, T.O. (1993). Refolding of Luciferase subunits from urea an assembly of the active heterodimer. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 10760-10775.
71. Einstein, E. y Shachmann, H.K. (1989). Determining the roles of subunits, en "Protein Function. A Practical Approach (ed. T.E. Creighton)
72. Lilly, M.D. y Dunhill, P. (1972). Engineering aspects of enzyme reactors. *Biotech. Bioeng. Symp*, 3, 221-227.
73. Barker, S.A. Emery, A.N. y NOvais, J.M. (1971). Enzyme reactors for industry. *Process Biochemistry*, 6, 10-11.
74. Uy, R. y Wold, F. (1977). Introduction of artificial crosslinks into proteins, en *Protein Crosslinks: Biochemical and Molecular Aspects* (Friedman, M., ed.) Plenum Press, New York.
75. Gordon, C.N. (1977). Electron microscopy of oligomeric protein stabilized by polyfunctional cross-links, en *Protein crosslinks: Biochemical and Molecular Aspects* (Friedman, M., ed.) Plenum Press, New York.
76. Lenders, J.P. y Crichton, R.R. (1984). Thermal stabilization of amylolytic enzymes by covalent coupling to soluble polysaccharides. *Biotechnology and Bioengineering*, 6, 1343-1351.
77. Swaisgood, H.E., Horton, H.R. y Mosbach, K. (1976). Covalent bound glutamate dehydrogenase for studies of subunit association and allosteric regulation, en *Metodos in Enzymology*, vol.XLIV, 504-515 (Mosbach, K. ed.) Academic Press, New York.

78. Guisán, J.M., Alvaro, G., Rosell, C.M., Garcia, J.L. y Tagliani, A. (1993). Stabilization of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: Penicillin acilase from *Kluyvera citrophila*. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 455-464.
79. Saidel, L.J., Leitzes, S. y Elfrig, W.H. (1964). The stability of chymotrypsin cross-linked with formaldehyde. *Biochi. Bioph. Res. Commun.*, 25, 409-413.
80. Khare, S.K. y Gupta, M.N. (1987). A crosslinked preparation of *Escherichia coli*  $\beta$ -D-galactosidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 16, 1-13.
81. Tatsumoto, K., Oh, K.K., Baker, J.O. y Himmel, M.E. (1989). Enhanced stability of glucoamilase through chemical crosslinking. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 20/21, 293-308.
82. Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V., Bastida A., Blanco, R.M., Alvaro, G. y Guisán, J.M. (1992). Stabilization of soluble proteins by intramolecular crosslinking with polifuncional macromolecules. Poly-(glutaraldehyde-like) structure, en *Stability and Stabilization of Enzymes. Proceedings of an International Symposium held in Maastrich, The Netherlands. W.J.J. van den Tweel, A. Harder and R.M. Buitelaar (Eds.). Elsevier Sc. Publ. B.V.*, 315-322.
83. Cavaille, D. y Combes, D. (1995). Caracterization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 22, 55-64.
84. Voget, G.E., Flores, M.V., Faloci, M.M., y Ertola, R.J.J. (1994). Effects of the ionic environment on the stability of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. *Food Sci. Technol.*, 27, 324-330.
85. Biermann, L. y Glantz, M.D. (1968). Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Saccaromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 167, 373-377.
86. Jabob, F. y Monod, J. (1961). *Journal of Molecular Biology*, 3, 318-356.

87. Karlsson, U., Koorajian, S., Zabin, I., Sjöstrand, F.S. y Miller, A. (1964). High resolution electron microcopy on highly purified  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli*. *J. Ultrastructure Research*, 10, 457-444469.
88. Fowler, A.V. y Zabin, I. 1977. The aminoacid secuencia of  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1507-1510.
89. Jacobson, R.H. Zhang, X.J., DuBose, R.F. y Matthews, B.W. (1994). Three-dimensional structure of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli*. *Nature*, 369, 761-766.
90. Wallenfels, K. y Weil, R. (1972).  $\beta$ -galactosidase, en *The enzymes*, vol. VII, 20, 617-663 (Boyer, P.D., ed.) Academic Press, New York.
91. Lederberg, J. (1950). The  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. *J. Bacteriol.*, 6,0 381-391.
92. Laemmli, U.K. (1970). Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*, 227, 680.
93. Henkenshoven, J. y Denrick, R. (1992). Native horizontal ultrathin polyacrylamide gel electrophoresis of proteins under basic and acid conditions. *Electrophoresis*, 13, 654-659.

\* \* \*